



# La testostérone, médiateur de l'honnêteté des signaux sexuels chez le mâle *Hyla arborea*?

Julia L. Desprat

## ► To cite this version:

Julia L. Desprat. La testostérone, médiateur de l'honnêteté des signaux sexuels chez le mâle *Hyla arborea*?. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10355 . tel-01314415

**HAL Id: tel-01314415**

**<https://theses.hal.science/tel-01314415>**

Submitted on 11 May 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ET L'ÉCOLE DOCTORALE Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation

DIPLÔME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 18 décembre 2015

Par

**JULIA L. DESPRAT**

---

**LA TESTOSTÉRONE, MÉDIATEUR DE L'HONNÊTÉTÉ DES  
SIGNAUX SEXUELS CHEZ LE MÂLE *HYLA ARBOREA* ?**

---

Directrice de thèse : Nathalie MONDY

Composition du Jury :

|                       |  |              |
|-----------------------|--|--------------|
| M. Dominique ALLAINE  | Professeur, Université Lyon1                       |              |
| M. Olivier CHASTEL    | Directeur de recherches, CNRS, Chizé               | (Rapporteur) |
| M. Michael GREENFIELD | Professeur, Université de Tours                    | (Rapporteur) |
| Mme. Nathalie MONDY   | Maître de conférences, Université Lyon 1           |              |
| M. Yannick MORET      | Chargé de Recherche, CNRS, Université de Bourgogne |              |
| M. Yann VOITURON      | Professeur, Université Lyon 1                      |              |



## REMERCIEMENTS

*Je voudrais tout d'abord remercier tous les membres du jury qui ont accepté de relire avec attention cette thèse, en particulier Olivier Chastel et Michael Greenfield, rapporteurs, pour leurs commentaires constructifs.*

*Il est important pour moi de remercier Nathalie Mondy, ma directrice de thèse pour l'excellent encadrement qu'elle a exercé durant ces 3 ans, me soutenant et m'encourageant dans les moments difficiles et sachant prendre du recul pour laisser grandir mon autonomie d'autres fois. Je voudrais te dire merci pour m'avoir donné envie de continuer ce métier, de m'avoir fait baigner dans l'enseignement tout au long de cette thèse, et de m'avoir montré que ce n'est pas incompatible avec la recherche. Je suis heureuse de pouvoir continuer un an de plus cette aventure ensemble. Merci d'avoir toujours été disponible, à l'écoute de mes nombreuses questions et impliquée dans l'avancée de mes travaux. Les nombreuses discussions que nous avons eues sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail. Merci pour le soutien scientifique et personnel sans faille.*

*Je voudrais également remercier Thierry Lengagne, pour les nombreuses discussions de paliers quand j'avais la flemme d'aller au bout du couloir voir ma « vraie » directrice. Tu fais partie de cette thèse. Merci d'avoir eu la patience de répéter x fois les définitions acoustiques, de m'avoir guidée sur le terrain avec passion et de m'avoir réveillée sur le chemin du retour et fait lever les yeux sur les branches qui surplombaient la route pour apercevoir ma première hulotte.*

*Puisque la devise est « publish or perish », il est évident que je dois remercier ceux qui m'ont sauvée de l'oubli scientifique et permis de publier mes recherches : mes collaborateurs scientifiques qui ont donné à cette thèse son caractère pluridisciplinaire. Merci à Floriant Bellvert pour l'expertise biochimique sur les caroténoïdes et le maniement de la « grosse machine » (UHPLC). Merci à Emmanuel Desouhant pour son aide précieuse dans les méandres des statistiques. Merci à Sara Puijalon pour m'avoir laissé appréhender une autre « grosse machine » (INSTRON) et pour son œil extérieur réconfortant. Merci à Caroline Romestaing pour avoir partagé avec moi un peu de son savoir sur les mitochondries et l'OROBOROS (oui, encore une autre machine). Enfin, merci à Loïc Teulier d'avoir été présent de la dissection de l'animal à la dissection des résultats pour l'article muscle, pour avoir su m'expliquer les résultats qui pour moi n'avaient alors pas le moindre sens, même pris à l'envers.*

*Je voudrais aussi dire merci à Adeline Dumet pour l'aide technique que j'ai reçu tout au long de cette thèse et d'avoir toujours été volontaire pour m'aider sur le terrain, la nuit, sous la pluie, pendant des heures. C'est vraiment la partie de ma thèse qui m'a fait le plus kiffer, même si ces petites bêtes savent trop bien se planquer. Je voudrais également remercier Angeline Clair pour s'être occupée avec amour des petites bêtes à l'EcoAquatron et de son aide pour les injections de PHA.*

*L'ensemble de ce travail de thèse représente 3 ans de manip concentrés sur les mois d'avril et mai durant lesquels la charge de travail n'était pas compatible pour une seule personne. Je ne m'en serai jamais sortie sans mes petits stagiaires (qui sont devenus grands),*

*Louise Ducroix, Morgane Couchet et Albane Rives (promo 2013) et Louise Cheynel et Guillaume Ruby (promo 2014). Merci à eux pour tout le travail accompli.*

*À côté du travail, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien au laboratoire.*

*Il y a les co-bureaux, Mathieu et Alice avec qui tout a commencé dans la joie et la bonne humeur, dans l'appréhension du début de la thèse. Et Mylène, avec qui j'ai partagé mon quotidien, mes angoisses et mes joies depuis presque un an. Tu vois la fin de mon épreuve alors que la tienne commence tout juste. Courage.*

*Il y a le groupe du midi. Le rendez-vous est à 11 h 45 dans le bureau rainette (c'est là qu'il fait le plus chaud) un peu comme le car de ramassage scolaire, presque toujours à l'heure. Tout au long de cette thèse, les têtes ont changé mais j'ai aimé partager le repas avec vous. Clémentine en tête pour rameuter tout le monde, Mathilde s'impatientant lorsque midi approche, Jérôme et Hugo daignant lever le nez de leurs écrans pour avaler quelque chose rapidement, Arnaud avec son humour particulier, Antonin toujours prêt à tester les nouveaux fromages, Ludovic et Jérémy pour une ambiance parfaite et une table bien remplie.*

*Il y a aussi tous ceux avec qui j'ai partagé ma bouteille de rhum en soirée apéro ToiToi et que je n'ai pas cités avant. Vous êtes nombreux : les plantouilles, les mitochondriales, les poiscailles, les fourmidables, les biosouts (ça fait scout).*

*A côté du laboratoire, je tiens particulièrement à remercier tous mes amis et ma famille de m'avoir soutenue de près ou de loin.*

*Un merci particulier à tout le BDP, pour les soirées qui m'ont changé les idées. Un merci encore plus gros à Cali, Bap et Floppy, informaticien- (ne)-s hors pair, qui ont travaillé à la réalisation du projet de grillons virtuels. Merci à mes globichettes qui malgré la distance sont mes amies les plus proches.*

*Je ne trouve pas mes mots pour dire à mon papoune combien je l'aime. « Pourquoi merci ? » me dirait-il... Parce que c'est toi qui tous les matins pendant mes études, même à plus de 500 km, me réveillais pour aller en cours et devenir meilleure. Parce que j'ai toujours pu compter sur toi, pour tout, même l'improbable et l'impossible. Parce que mes choix et ma carrière sont en partie le fruit de ton éducation (si, si je t'assure, y a des études qui le disent). Merci.*

*À ma sœur chérie que j'aime et que j'adore... Merci pour beaucoup de choses en fait. Pour m'avoir réconfortée plusieurs fois, pour m'avoir fait rire encore plus. Pour avoir partagé avec moi la passion de la recherche, pour avoir accepté de relire les fôtes d'ortographe de cette thèse (s'il en reste, c'est sa faute du coup). Pour être toujours à mes côtés, merci.*

*À Laurent, enfin, pour faire partie de ma vie depuis un peu plus de 4 ans. Merci pour ton soutien inconditionnel depuis le début de la thèse, quand tu as tout quitté pour me suivre sur Lyon. Tu m'as supportée et encouragée sans retenue jusqu'à la fin. Merci également à tes talents de cuisinier et de pâtissier du dimanche. Je t'aime.*

« C'est la fête au village des animaux et même le photographe est venu. Tous les animaux se réunissent mais ils ne veulent pas que la grenouille soit sur la photo car elle ne sait pas fermer sa grande bouche. La grenouille est triste alors son amie la petite souris la console et lui donne une astuce : au moment de la photo, il faut dire *confiture de mûres* en serrant bien les lèvres. La grenouille est contente, et elle répète sa petite phrase plusieurs fois. C'est le moment. Tous les animaux prennent place sur les bancs. La grenouille est avec eux, elle est heureuse. Alors quand tout est prêt, le photographe dit 'cheese'. La grenouille repense fort à sa phrase, mais dans la panique, elle dit : **marmelade de poire** ! »

Histoire drôle que me racontait ma maman



## TABLE DES MATIÈRES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>RÉSUMÉ .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>INTRODUCTION .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>I / Honnêteté du signal et hypothèse du handicap immunitaire.....</b>          | <b>11</b> |
| <b>II / Signalisation et sélection sexuelle.....</b>                              | <b>14</b> |
| 1) Signaux acoustiques.....   | 15        |
| a) <i>Communication acoustique et sélection sexuelle .....</i>                    | <i>15</i> |
| b) <i>Production acoustique : cas des anoures .....</i>                           | <i>16</i> |
| i. Mécanismes de production du son.....   | 16        |
| ii. ...et conséquences métaboliques .....   | 17        |
| 2) Signaux visuels .....  | 20        |
| a) <i>Communication visuelle et sélection sexuelle.....</i>                       | <i>20</i> |
| b) <i>Caroténoïdes : structure et fonctions .....</i>                             | <i>21</i> |
| 3) Comportement d’approvisionnement alimentaire.....                              | 22        |
| a) <i>Approvisionnement alimentaire et production de signaux acoustiques ....</i> | <i>23</i> |
| b) <i>Approvisionnement alimentaire et production de signaux visuels .....</i>    | <i>24</i> |
| <b>III / Effets de la testostérone sur la signalisation sexuelle .....</b>        | <b>25</b> |
| 1) Testostérone et signaux acoustiques .....                                      | 25        |
| 2) Testostérone et signaux visuels.....   | 26        |
| 3) Testostérone et comportement d’approvisionnement alimentaire .....             | 27        |
| <b>IV / Immunocompétence et testostérone .....</b>                                | <b>28</b> |



|   |            |
|---|------------|
| <b>VI / Objectifs et hypothèses .....</b>   | <b>30</b>  |
| <b>VII / Modèle biologique.....</b>   | <b>31</b>  |
| <b>PRÉSENTATION DES ARTICLES .....</b>  | <b>35</b>  |
| <b>Article 1 : A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog <i>Hyla arborea</i> .....</b>                             | <b>37</b>  |
| <b>Article 2 : Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity ? .....</b>   | <b>47</b>  |
| <b>Article 3 : Caloric restriction and testosterone affect mitochondrial functioning and contractile properties of calling muscles in <i>Hyla arborea</i> .....</b> | <b>59</b>  |
| <b>Rapport 4 : Couleur du sac vocal et effet de la testostérone sur les flux de caroténoïdes.....</b>   | <b>85</b>  |
| <b>Article 5 : Foraging behavior and testosterone: supplemented males are better hunters .....</b>  | <b>104</b> |
| <b>DISCUSSION.....</b>  | <b>120</b> |
| <b>I/ Les hormones, outils idéal pour une approche intégrative .....</b>  | <b>120</b> |
| <b>II/ Implications physiologiques de la testostérone sur la production de signaux acoustiques .....</b>  | <b>120</b> |
| <b>III/ La testostérone, médiatrice du signal visuel chez <i>Hyla arborea</i>? .....</b>  | <b>123</b> |
| <b>IV/ Testostérone et comportement de chasse : effet indirect sur la production des signaux sexuels ? .....</b>  | <b>125</b> |
| <b>V/ Testostérone et immunité.....</b>   | <b>127</b> |
| <b>VI/ Communication multimodale et étude multimodale .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>PERSPECTIVES .....</b>   | <b>131</b> |
| <b>I/ L'ICHH modulée par le stress ? .....</b>  | <b>131</b> |
| <b>II/ La coloration du sac vocal, indice fiable de l'état sanitaire du mâle ? .....</b>  | <b>132</b> |
| <b>III/ La variabilité du choix femelle, quel est le rôle des hormones ? .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>  | <b>135</b> |

## RÉSUMÉ

### **La testostérone, médiateur de l'honnêteté des signaux sexuels chez *Hyla arborea* ?**

Mots-clefs : anoures, bioénergétique, caroténoïde, contraction musculaire, hypothèse du handicap immunitaire, testostérone.

Chez les mâles, la testostérone joue un rôle important dans l'expression des signaux sexuels attractifs pour la femelle. Cependant, de nombreuses études mettent en évidence l'effet négatif de la testostérone sur les défenses immunitaires ou la résistance aux parasites. Selon l'hypothèse du handicap immunitaire (ICHH, Folstad et Karter, 1992), ce compromis permettrait d'assurer l'honnêteté du signal sexuel ; les mauvais mâles ne pouvant pas exprimer de signaux sexuels de bonne qualité tout en gérant l'immunosuppression due à la testostérone. Ma thèse a pour objectif de définir le rôle de la testostérone dans l'honnêteté des signaux sexuels dans un contexte de communication multimodale. Elle permet également de comprendre les mécanismes physiologiques par lesquels la testostérone module les signaux sexuels acoustiques et visuels chez les mâles *Hyla arborea*, un amphibien connu pour utiliser ces deux types de signaux pour attirer les femelles. Nos résultats montrent que les signaux sexuels acoustiques et visuels chez cette espèce sont testostérone-dépendants. En revanche, puisque la testostérone n'a pas d'effet immunosuppresseur dans notre étude, elle ne serait pas le médiateur direct de l'honnêteté des signaux chez cette espèce. D'un point de vue physiologique, l'effet de la testostérone sur le chant s'explique par l'amélioration des propriétés contractiles des muscles du tronc responsables du chant lié à une augmentation de l'efficacité mitochondriale. D'autre part, les analyses biochimiques montrent que la couleur du sac vocal varie linéairement avec la quantité de pigments caroténoïdes présents dans le plasma, qui pourrait être testostérone-dépendant. Enfin, cette thèse montre également que la testostérone agit sur le comportement de chasse permettant l'acquisition de ressources énergétiques et de caroténoïdes pour le chant et la couleur des mâles.



## INTRODUCTION

### I / Honnêteté du signal et hypothèse du handicap immunitaire

La sélection sexuelle, concept introduit pour la première fois par Darwin en 1859 puis développé dans son second livre en 1871, explique l'avantage compétitif qu'ont certains individus pour accéder à la reproduction. Cette sélection est le résultat de stratégies visant à accroître les chances d'un individu de trouver un partenaire pour se reproduire et de donner naissance à des descendants capables de se reproduire à leur tour. À la base de ce processus, se trouvent le choix du partenaire par la femelle et la compétition entre les mâles pour accéder aux femelles. Environ un siècle plus tard, plusieurs auteurs suggèrent que la compétition ne s'arrêterait plus seulement à l'accès à l'accouplement, mais continuerait à l'intérieur même de la femelle avec la compétition spermatique (Parker, 1970) - définie par la compétition entre les éjaculats de différents mâles pour la fertilisation d'un set donné d'ovocytes à l'intérieur du tractus génital de la femelle - et le choix cryptique des femelles (Thornhill, 1984 ; Eberhard, 1996) - processus amenant la femelle à favoriser le sperme d'un mâle au détriment des autres.

Dans ce cadre théorique, comment les femelles arrivent-elles à estimer la qualité des mâles et à choisir leur partenaire sexuel ? Zahavi (1975, 1977) suggère dans la théorie du handicap que la qualité phénotypique des mâles est exprimée par des caractères handicapant la survie de l'individu. L'hypothèse centrale de ce principe, qui permet d'expliquer le maintien évolutif du système de communication, est que le signal est coûteux à produire et/ou à maintenir. Ce coût est plus abordable pour un individu de bonne qualité, ou de meilleure viabilité, que pour un individu de faible qualité (Graffen, 1990). La notion de coût est donc particulièrement importante. Il est généralement admis qu'un signal répondant au principe du handicap doit induire deux types de coût : le coût d'efficacité (*efficacy cost*) et le coût stratégique (*strategic cost*, Guilford et Dawkins, 1991). Le premier est le coût nécessaire à l'envoi du signal et au caractère correct de sa perception, le second est le coût nécessaire pour assurer l'honnêteté et limiter la tricherie. Cependant, l'ensemble de ces modèles assument, parfois de manière implicite, qu'il existe une contrainte liant le coût stratégique et le coût d'efficacité pour expliquer l'honnêteté des signaux. Cette contrainte n'est cependant pas nécessaire pour atteindre un équilibre évolutif stable du signal et plusieurs modèles ont montré que l'honnêteté du signal pouvait être maintenue même avec des coûts nuls ou négatifs (Szamado, 2011). En effet, le signal n'est pas forcément coûteux pour être honnête si un signal malhonnête l'est davantage (Getty, 1998a). Getty (1998b) montre d'ailleurs de manière générale que les émetteurs de signaux de meilleure qualité sont plus efficaces à convertir leurs signaux en *fitness* que les mâles de moins bonne qualité.

La prise en compte de ces signaux par les femelles peut lui assurer des bénéfices directs. Les bénéfices directs concernent la capacité du mâle à fournir divers avantages matériels à la femelle comme les cadeaux nuptiaux (exemple Gwynne, 1993), la capacité à défendre un territoire riche en ressources (exemple Hermann et al., 2015), l'aide aux soins parentaux (exemple Huber et al., 2002) mais également la non-transmission de pathogènes/parasites lors de la fécondation (exemple Able, 1996). Le bénéfice conféré par le choix du mâle peut aussi être indirect s'il affecte, non pas directement la *fitness* de la femelle, mais celle de ses descendants. Dans ce cas, les avantages sont transmis sous forme génétique par le mâle à ses descendants. Dans le cadre de traits héritables, choisir un mâle exhibant des signaux sexuels coûteux et/ou attractifs garantit à la femelle d'avoir des descendants plus compétitifs car de meilleure qualité (*good genes hypothesis*, Hamilton et Zuk, 1982 ; revue par Anderson, 1994) et plus attractifs pour leur propre reproduction (*sexy son hypothesis*, Weatherhead et Robertson, 1979). Enfin, une femelle peut choisir le mâle susceptible de fournir les descendants les plus viables compte tenu de son propre potentiel génétique. La femelle choisit alors un mâle dont le patrimoine génétique est le plus compatible (par complémentarité) avec le sien, par le biais du complexe majeur d'histocompatibilité par exemple.

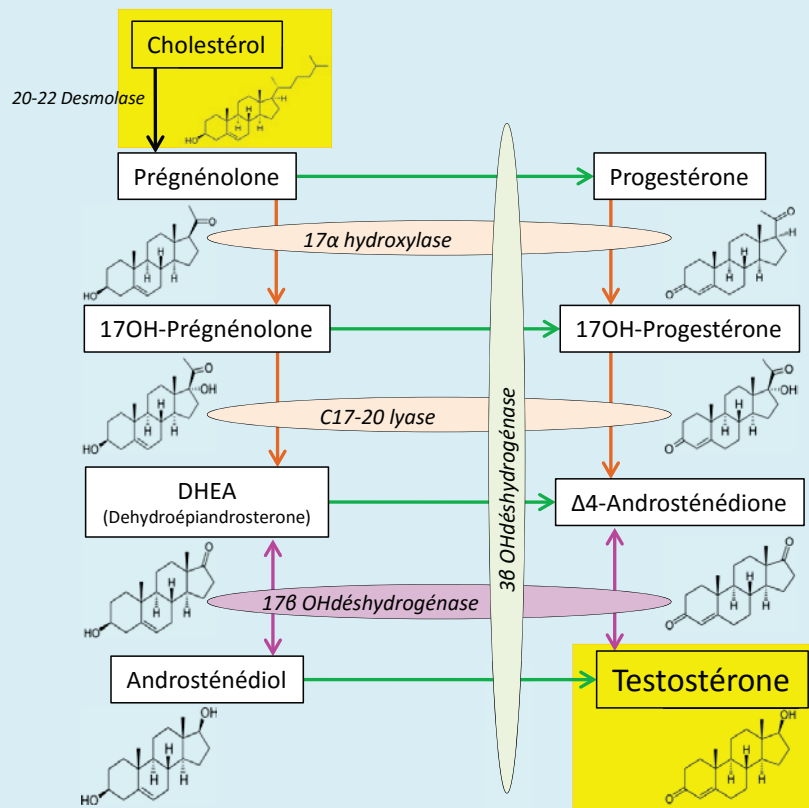
En 1982, Hamilton et Zuk proposent un modèle de sélection sexuelle influencé par le parasitisme. Des caractères sexuels de bonne qualité, comme un plumage éclatant chez les oiseaux, permettraient de discriminer les individus capables de résister aux parasites. L'expression de ces traits étant liée à des gènes de résistance parasitaire, leur degré d'expression indiquerait l'héritabilité de la résistance des mâles. En effet, une meilleure résistance aux parasites permet une charge parasitaire plus petite et une meilleure condition qui se reflètent sur la qualité du signal sexuel émis. Une telle condition dépendance du développement des caractères sexuels assure l'honnêteté du signal sexuel (Johnstone, 1995).

En 1992, dans un article fondateur, Folstad et Karter proposent l'hypothèse de handicap immunitaire (*immunocompetence handicap hypothesis* : ICHH) qui intègre, à la fois le principe de Zahavi (1975) et le modèle de Hamilton et Zuk (1982). Selon ces auteurs, il existe un compromis, régulé par la testostérone (encadré 1) entre le système immunitaire et la production des signaux sexuels secondaires. Reprenant les termes de Folstad et Karter (1992), la testostérone serait « une épée à double tranchant » avec, d'un côté, la stimulation de la mise en place des caractères sexuels secondaires (bénéfices à la reproduction) et, de l'autre, une baisse de l'immunité de l'individu (coûts en termes de survie). Ainsi, seuls les individus de bonne qualité phénotypique seraient-ils capables de maintenir un taux de testostérone élevé

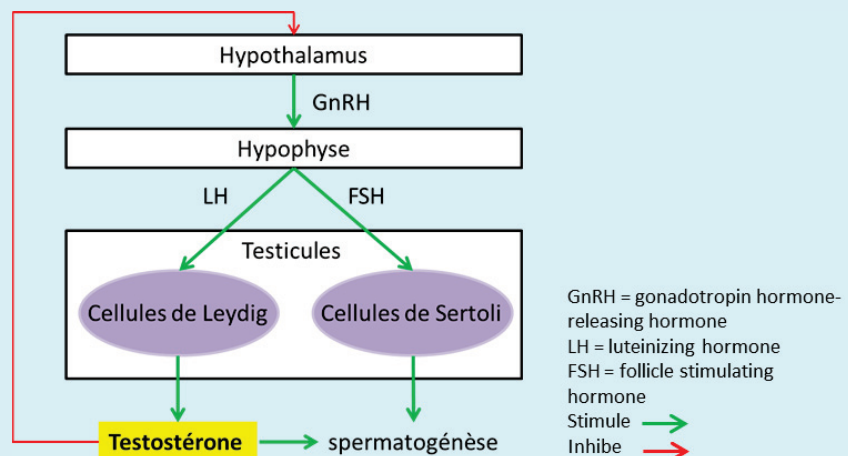
nécessaire à l'expression de caractères sexuels attractifs tout en supportant l'effet immunosuppresseur de cette hormone.

### Encadré 1 : Synthèse et régulation de la testostérone

La biosynthèse de cette hormone stéroïde sécrétée principalement au niveau des testicules par les cellules de Leydig (mais également au niveau des glandes surrénales en plus faibles proportions) se fait à partir du cholestérol (Fig. 1A). Elle est impliquée, entre autres, dans la régulation de la gamétogenèse mâle (Müller et al., 2014 ; Wingfield et al., 1990 ; Fig. 1B), mais aussi dans la production des caractères sexuels secondaires.



**Figure 1A : Biosynthèse de la testostérone à partir du cholestérol.** En encadré, le nom des molécules précurseurs de la testostérone ; en italique les enzymes responsables de différentes étapes du processus de synthèse de la testostérone. Les flèches indiquent le sens de la réaction chimique catalysée par ces enzymes qui peut être réversible (double flèche) ou pas (flèche unique).



**Figure 1B : Sécrétion et régulation de la testostérone** (d'après Amory et Bremner, 2003)

L'ICHH repose donc, tout d'abord, sur le fait que la testostérone serait le principal médiateur de l'expression des caractères sexuels secondaires attractifs pour les femelles (couleur plus vive, chant plus grave par exemple). Ensuite, la seconde hypothèse de l'ICHH est que l'augmentation du taux de testostérone s'accompagne d'une baisse de l'immunité de l'individu induisant un coût en termes de survie. La principale prédiction de l'ICHH est donc que le compromis entre reproduction et immunité est autorégulé par le taux de testostérone et que cette régulation est parasite/pathogène dépendante. Dans ce contexte, l'attaque de parasites devrait faire chuter le taux de testostérone de l'individu traduisant la réallocation à la survie *via* la stimulation du système immunitaire.

Une extension post-copulation de l'ICHH suggère que les défenses immunitaires compromettent également la capacité du mâle à produire des éjaculats de haute qualité (Fosltad et Skarstein, 1997). Cette hypothèse a été formulée pour les vertébrés et suppose que les propriétés immunosuppressives de la testostérone sont nécessaires pour limiter l'attaque par le système immunitaire du mâle sur ses spermatozoïdes (Fosltad et Skarstein, 1997). L'hypothèse peut être généralisée si l'on suppose un compromis d'allocation des ressources entre la production de sperme et la fonction immunitaire. Les mâles qui sont obligés de lutter contre une infection paient un coût de réduction de la qualité du sperme.

## **II / Signalisation et sélection sexuelle**

Les interactions entre les individus en période de reproduction sont déterminantes et la communication tient une place centrale lors du choix du partenaire. La communication peut être définie comme étant le transfert d'une information entre deux individus, un émetteur et un récepteur, menant à une prise de décision du récepteur (Shannon et Weaver, 1964 ; Marler, 1977). Les informations sont portées par des signaux qui peuvent être de différentes natures (acoustiques, visuels, chimiques...) et qui sont transmis au récepteur *via* un canal de transmission. Le canal de transmission peut être défini comme le milieu physique servant de support au transfert de l'information, i.e. l'environnement et ses « obstacles ». Les signaux portant les informations peuvent être plus ou moins déformés par ce canal suivant la modalité sensorielle utilisée. De manière évidente, un signal coloré comme la couleur du plumage de certains oiseaux sera plus facilement perçu de jour que de nuit. De la même façon, les signaux sismiques ne seront pas transmis de la même manière selon la résistance physique des supports : liquide ou solide par exemple (Gordon et Uetz, 2011).

Dans le cadre de la sélection sexuelle les signaux permettent, entre autres, au récepteur (le plus souvent la femelle) de se baser sur les informations transmises par l'émetteur (dans ce cas, le mâle) pour choisir son partenaire. L'utilisation simultanée de plusieurs modalités

sensorielles (communication multimodale) est une stratégie adoptée par de nombreuses espèces (Van Doorn et Weissing, 2004 ; Partan et Marler, 2005). Les coliaïdes de la luzerne mâles (*Colias eurytheme*) utilisent à la fois la réflectance dans l'ultraviolet sur leurs ailes (signal sexuel visuel) mais également des phéromones (signal sexuel chimique) pour attirer les femelles (Papke et al., 2007). Les oiseaux sont également très étudiés pour leurs chants complexes et la coloration de plumage élaborés (O'Loughlen et Rothstein, 2010). La communication multimodale permet de transmettre l'information de façon plus efficace soit en répétant la même information dans plusieurs modalités sensorielles de manière à augmenter la probabilité de réception (*backup signal hypothesis*), soit en transmettant des informations différentes de manière simultanée - *multiple signal hypothesis* (Johnstone, 1996 ; Rowe, 1999 ; Candolin, 2003).

### 1) Signaux acoustiques

#### a) *Communication acoustique et sélection sexuelle*

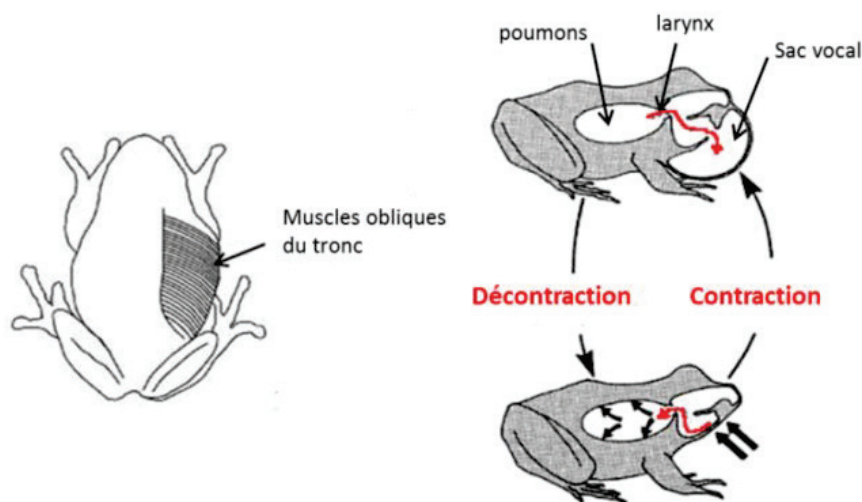
Comme les autres types de signaux, un signal acoustique transmet une ou plusieurs informations pour le récepteur. Ce type de signaux favorise la communication sur des distances parfois très importantes. Le rugissement d'un lion peut atteindre 114 dB à 1 m (Klemuk et al., 2011) et peut s'entendre sur 8 km. Une grande diversité de taxons incluant les oiseaux mais aussi les amphibiens et les mammifères sont connus pour produire des chants forts et répétitifs qui reflètent la taille, la condition corporelle et sanitaire ou les aptitudes à combattre des mâles (exemples Zolliger et Brumm, 2015 ; Koren, et Geffen, 2009 ; Kelley, 2004). Les mâles crapauds calamites (*Bufo calamita*) utilisent le niveau sonore des chants d'avertissement des autres mâles présents sur le site pour évaluer la taille et l'habilité à se battre de leurs opposants (Arak, 1983). De la même façon, la discrimination de la qualité des mâles par les femelles fait souvent appel aux signaux acoustiques. Par exemple, chez les cervidés *Cervus elaphus*, le brame des gros mâles possède des caractéristiques acoustiques différentes de celui des plus petits mâles, ce qui permet aux femelles de reconnaître par le signal acoustique les meilleurs partenaires potentiels (Charlton et al., 2007). Chez certaines espèces d'oiseaux, la taille du répertoire acoustique semble porter une information sur la qualité des mâles et affecter le choix des femelles (Byers et Kroodsma, 2009). Certains paramètres acoustiques comme la fréquence d'émission des chants et leurs durées sont très variables d'un individu à l'autre d'une même espèce et sont soumis à de fortes pressions de sélection (revue par Leary, 2009) bien que l'appareil vocal soit contraint par des forces physiques et physiologiques.



## b) Production acoustique : cas des anoures

### i. Mécanismes de production du son...

D'un point de vue mécanique, la production de son chez les anoures est relativement simple. Au cours du cycle respiratoire, l'air est pompé dans les poumons par pression des muscles buccaux (Wells, 2007). Quand le mâle chante, l'air est propulsé hors des poumons par la contraction des muscles de la région du tronc et traverse le larynx vers la cavité buccale. Lorsque l'air passe dans le larynx, la vibration des cordes vocales et des cartilages associés produit le son (Figure 2, Pough et al., 1992).



**Figure 2 : Mécanisme de production acoustique chez les anoures.** Lorsque les muscles obliques du tronc sont décontractés, la rétraction du sac vocal permet à l'air d'entrer dans les poumons. Par contraction, les muscles obliques du tronc propulsent de l'air des poumons vers le sac vocal. En passant par le larynx, la vibration des cordes vocales produit le son. Les flèches rouges indiquent le sens du mouvement de l'air entre les poumons et la cavité buccale. La double flèche noire indique le mouvement de rétraction du sac vocal. *Figure modifiée d'après Girgenrath et March, 1997.*

De telles performances de chant ne seraient pas possibles sans la poche de peau élastique connectée au plancher de la cavité buccale qui peut contenir de l'air et le repousser dans les poumons : le sac vocal. En effet, le signal acoustique chez la plupart des anoures est accompagné du gonflement d'un ou plusieurs sacs vocaux. Le sac vocal permet de recycler l'air plus rapidement durant les vocalises afin d'augmenter la cadence d'émission des chants (Pauly et al., 2006). Il sert également à repartir les ondes acoustiques de manière omnidirectionnelle autour de l'émetteur (Pauly et al., 2006 ; Starnberger et al., 2014b). Il n'existe pas de description géométrique quantitative de l'expansion du sac vocal chez les anoures. Bien que son rôle dans la production du signal, en relation avec le larynx, ne soit pas clairement établi (Jamarillo et al., 1997 ; Griddi-Papp, 2008 ; Bernal et al., 2009), il a été suggéré que les composantes à haute fréquence du son soient dues aux vibrations à grande vitesse du sac.

La production du son implique donc trois grandes unités fonctionnelles : 1) les muscles du tronc qui donnent l'énergie mécanique au système, 2) l'appareil laryngal qui produit le son et 3) la cavité buccale et le sac vocal pour la transmission du son (Wells, 2007). Bien que les mécanismes de production du son soient similaires chez la plupart des anoures, les détails de la structure des chants varient selon les différences fonctionnelles de ces trois composants.

Chez les anoures, l'activité musculaire associée à la production de chant est très importante. D'après Pough et al. (1992), les mâles rainettes crucifères (*Hyla crucifer*) contractent leurs muscles deux fois par seconde et plusieurs heures dans la nuit. Certains individus peuvent produire pas loin de 30 000 contractions des muscles du tronc en une nuit, même si la plupart des espèces d'anoures ont un taux plus proche de 13 000 ou 15 000 contractions. Cette activité musculaire et le coût métabolique qui en résulte peuvent être une source de stress chez les mâles au moment de la saison de reproduction. Emerson et Hess (2001) proposent un modèle selon lequel la relation entre les niveaux de stéroïdes et la vocalisation est dynamique. Par exemple, les androgènes peuvent exercer un effet précoce sur la motivation à chanter chez les grenouilles (Solis et Penna, 1997). Cependant, une fois que le mâle commence à chanter à un certain niveau, la relation peut évoluer en fonction de l'effort énergétique global nécessaire pour produire les vocalises et les taux de stéroïdes (Emerson et Hess, 2001). Des études sur les taux de stéroïdes chez plusieurs espèces de crapaud *Bufo* suggèrent un mécanisme dépendant des niveaux de corticostérone (Leary et al., 2006, 2008), mais apparemment indépendant de réserves d'énergie, contrairement aux prédictions du modèle de vocalisation proposé par Emerson et Hess (2001).

## ii. ...et conséquences métaboliques

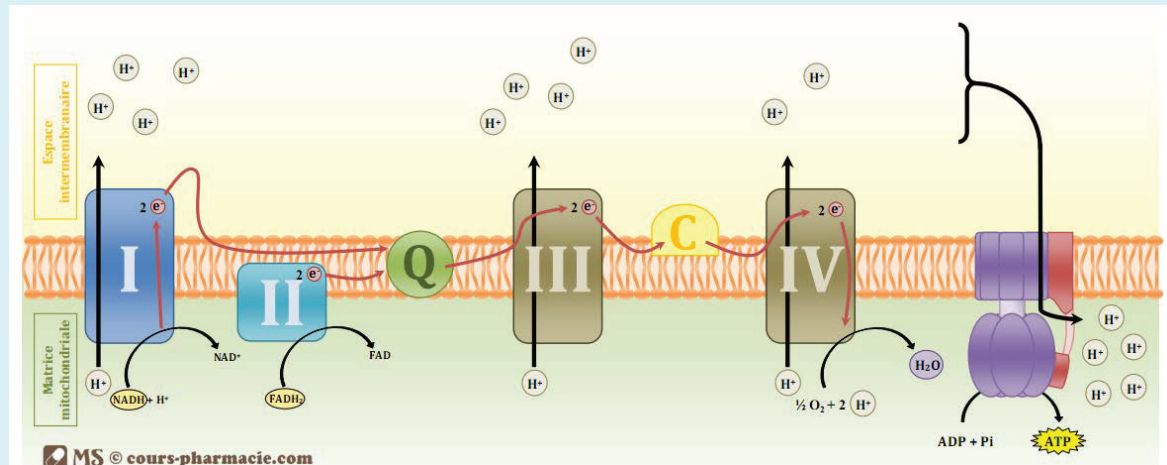
L'utilisation de signaux acoustiques entraîne une augmentation du métabolisme de l'individu de par l'activité intensive et prolongée des muscles (Taigen et Wells, 1985). Les performances acoustiques des anoures sont pratiquement entièrement supportées par le métabolisme aérobie (Marsh et Taigen, 1987 ; Grafe, 1996 ; Ressel, 1996 ; McLister et al., 2001). Les coûts peuvent donc être estimés directement par des mesures de consommation d'oxygène sur des mâles chantant dans de petites boîtes reliées à un oxymètre (exemple Voituron et al., 2009, 2012). De telles mesures ont montré que les consommations d'oxygène du mâle durant le chant sont environ 25 fois plus élevées qu'au repos et 60% plus grandes que lors d'un exercice locomoteur (Prestwich, 1994 ; Pough et al., 1992).

D'un point de vue histochimique, les muscles du tronc sont spécifiques et donnent des indications sur le métabolisme. Chez *Hyla versicolor*, ils sont composés à 100% de fibres

oxydatives rapides généralement utilisées pour des mouvements répétitifs rapides. À l'inverse, les muscles des pattes contiennent principalement (à 75%) des fibres glycolytiques rapides (Marsh et Taigen, 1987). Il a été montré que des grenouilles ayant des chants rapides et nombreux avaient également des muscles avec des densités mitochondriales et des taux d'activités des enzymes cataboliques, comme la citrate synthase, plus élevés que celles avec un taux de chant plus faible (Ressel, 1996).

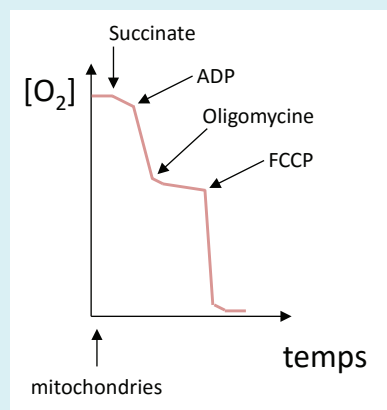
Les mitochondries, par l'intermédiaire de la phosphorylation oxydative, jouent un rôle majeur dans la modulation d'un grand nombre de voies métaboliques cellulaires complexes pour produire l'énergie chimique (voir Figure 3A, encadré 2) et répondre à la demande métabolique des fonctions cellulaires. Le fonctionnement mitochondrial peut être étudié par oxygraphie de précision (Figure 3B, encadré 2). Dans les muscles, l'énergie produite par les mitochondries est utilisée pour déclencher le mécanisme de contraction des muscles. Pour rappel, la contraction musculaire est généralement décrite en quatre étapes : 1) la séparation : l'adénosine triphosphate (ATP) se fixe sur une tête mobile de myosine qui se libère ainsi de son lien avec le filament d'actine, 2) l'activation : les têtes de myosine hydrolysent l'ATP et changent de conformation, 3) la fixation : en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , les têtes de myosine activées reforment un pont d'union avec le filament d'actine, et 4) la désactivation : les têtes de myosines fixées pivotent (retour à la position non activée) faisant glisser l'actine en direction du centre du sarcomère. L'efficacité mitochondriale des muscles du tronc, produisant l'énergie chimique sous forme d'ATP, peut ainsi être reliée aux propriétés contractiles des muscles du tronc responsables de la production acoustique.

## Encadré 2 : Mitochondries et production d'énergie



**Figure 3A : Chaîne respiratoire mitochondriale** formée des 4 complexes et de l'ATP synthétase.

La phosphorylation oxydative est le processus par lequel l'ATP est synthétisé lorsque les électrons sont transférés du NADH à l'oxygène par une série de transporteurs d'électrons. La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 4 complexes enzymatiques et de protéines. **Le complexe I** (NADH-Q oxydoréductase) récupère les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire. **Le complexe II** (Succinate-Q réductase) récupère les électrons du FADH<sub>2</sub>. **Le coenzyme Q** (ou ubiquinone) permet la transition des électrons entre le complexe I ou II et le complexe III. **Le complexe III** (Q-cytochrome c réductase) permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire. **Le cytochrome c** est une protéine qui permet la transition des électrons entre le complexe III et le complexe IV. **Le complexe IV** (Cytochrome c oxydase) permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire à partir de l'oxygène. Enfin, **l'ATP Synthétase** est un complexe protéique de la membrane interne de la mitochondrie. Les protons H<sup>+</sup> sont transférés de l'espace inter-membranaire à la matrice mitochondriale par l'ATP synthétase qui permet la phosphorylation de l'ADP en ATP.



**Figure 3B : Étude des différents états respiratoires mitochondriaux à partir de mitochondries isolées ou de fibres perméabilisées placées dans un oxygraphe.** La consommation d'oxygène peut être calculée à partir de la variation de la concentration d'oxygène dans un milieu fermé ([O<sub>2</sub>] max = 100%). La consommation d'oxygène est mesurée en présence 1) de succinate (respiration basale), 2) d'oligomycine qui est un inhibiteur spécifique de l'ATP synthase et 3) de FCCP (p-trifluorométhoxy-carbonyl-cyanide-phényl) qui est un protonophore (protéine découplante). Les mitochondries sont ajoutées au temps 0. Le succinate est le substrat oxydé.

En condition normale, l'addition d'ADP accélère la consommation d'oxygène et parallèlement de l'ATP est produit. Quand un inhibiteur de l'ATP synthase est ajouté au milieu, la consommation d'oxygène revient à son niveau initial, i.e. très faible (mais pas nulle, ce qui correspond aux fuites du système). L'addition d'un protonophore, une substance qui rend la membrane interne perméable aux protons, accélère fortement la consommation d'oxygène. Puisque le passage des protons dans l'espace vers la matrice n'est possible qu'au niveau de l'ATP synthase, la dissipation de la différence de potentiel électrochimique par l'ATP synthase contrôle la vitesse des réactions d'oxydoréductions canalisées par la chaîne respiratoire.

## 2) Signaux visuels

### a) *Communication visuelle et sélection sexuelle*

La communication visuelle regroupe tous les signaux transmis *via* la modalité sensorielle visuelle. Les signaux visuels peuvent prendre plusieurs formes comme les signes (les mimiques, la posture, la parade) mais aussi la couleur (les motifs, la clarté, la saturation, les différentes teintes). L'ensemble de ces signaux peut renseigner sur la toxicité aux prédateurs (signal aposématique), le sexe, la qualité du partenaire. Par exemple, les mimiques faciales, très étudiées chez les singes et les rongeurs, informent le récepteur de la nature agressive ou bienveillante de l'émetteur qu'il interprète principalement grâce au cortex visuel primaire de son cerveau (Brecht et Freiwald, 2012). La « danse » des abeilles permet d'indiquer, entre autres, aux fourrageuses de la ruche la distance et la direction par rapport au soleil de la source de nourriture trouvée (travaux de Karl von Frisch, prix Nobel 1973). De la même façon, les mouvements effectués par les mâles durant la parade nuptiale, chez les oiseaux ou les poissons par exemple, font partie de la communication visuelle entre les individus. Dans le contexte de la sélection sexuelle, la couleur arborée par les animaux est cependant le signal visuel le plus étudié.

Pour être efficace, le signal doit être correctement perçu par le récepteur. Les adaptations sensorielles pour améliorer la détection sont une part importante de l'évolution de la communication entre les individus. Une récente étude a mis en évidence la coévolution existante entre les signaux visuels et la morphologie des yeux chez les guêpes *Polistes* (Sheehan et al., 2014). L'étude des capacités du récepteur à percevoir le signal visuel est une question importante et souvent abordée dans l'étude des signaux visuels. La vision est possible grâce à deux sortes de photorécepteurs dans la rétine : les bâtonnets, utilisés pour la vision en faible conditions de lumière et les cônes, utilisés pour la vision des couleurs. La vision nocturne n'est possible que si les bâtonnets sont présents. Une déficience des cônes altère la vision du signal coloré (c'est le cas chez le taureau qui voit en noir et blanc, Nomura et al., 2001). Chez les anoures, certaines espèces sont nocturnes. La vision en faible condition lumineuse leur permet de chasser et pour se reproduire, ces espèces ont besoins de la vision en couleur. La synthèse des deux types de photorécepteurs est possible chez les anoures (Siddiqi et al., 2004).

L'expression de caractères sexuels mâles colorés est utilisée chez de nombreux taxons pour attirer la femelle (Anderson et Iwasa, 1996). Les lézards *Anolis* se fient quasi-exclusivement aux signaux visuels : la couleur de leur fanon gulaire avertit de leur position et attire les femelles (Leal et Fleishman, 2004). Chez les oiseaux, la coloration du plumage, mais

aussi du bec ou du pourtour de l'œil, peuvent être utilisées comme des signaux sexuels visuels par les femelles (Hill, 1991 ; Faivre et al., 2003). Chez les anoures, il existe plusieurs types de signaux colorés pouvant influencer la femelle : la ligne latérale chez les rainettes arboricoles (*Hyla arborea*, Gomez et al., 2009), les motifs noirs plus ou moins marqués sur le dos des crapaud mâles (*Scaphiopus couchi*, Vásquez et Pfenning, 2007) ou encore, la couleur du sac vocal (revue par Starnberger et al., 2014a).

Toutes les couleurs ne se forment pas de la même façon. Il existe des couleurs structurelles, qui se modifient en fonction de l'incidence de la lumière, comme les ailes de papillon ou des coléoptères et des cristaux liquides et des couleurs pigmentaires liées à la présence de composants chimiques absorbant certaines longueurs d'onde dans le tégument de l'animal. Les premières relèvent de l'ordre de la physique, les secondes de la chimie (revue par Kemp et al., 2011). Parmi les pigments principalement trouvés chez les animaux, les caroténoïdes sont responsables de la couleur rouge orangé.

#### *b) Caroténoïdes : structure et fonctions*

Les caroténoïdes sont des pigments isoprénoïdes composés de 40 atomes de carbone (structure chimique de base commune  $C_{40}H_{56}$ ). Les caroténoïdes contenant une ou plusieurs fonctions oxygénées sont classés parmi les xanthophylles ; les carotènes ne contenant que la chaîne d'hydrocarbone (Britton, 1995). Ils absorbent les courtes longueurs d'onde (i.e. le bleu et le violet) et apparaissent rouge orangé ou jaunes en fonction du nombre de doubles liaisons présentes sur leur chaîne carbonée. Les caroténoïdes sont liposolubles et hydrophobes (Britton, 1995). Ils sont synthétisés par les plantes au niveau des plastes. Ils constituent pour les vertébrés une ressource limitante puisqu'ils ne sont pas synthétisables *de novo* par l'organisme, leur acquisition dépend de leur alimentation. Chez les animaux, les caroténoïdes exogènes se retrouvent soit dans les lipides, soit dans la peau ou les structures protéinées comme les plumes, les écailles ou les élytres des insectes (Olson et Owens, 1998). Les caroténoïdes sont les précurseurs de la vitamine A nécessaire à la croissance osseuse et à la vision. L'absorption, le transport et le métabolisme des caroténoïdes dans l'organisme a été très étudié pour le  $\beta$ -carotène (Parker, 1996) car c'est le caroténoïde majoritaire de l'alimentation chez les humains. Le transport des caroténoïdes dans le plasma se fait exclusivement à l'aide de lipoprotéine (revue par Parker, 1996).

Chez de nombreuses espèces, les couleurs éclatantes exprimées dans des teintes rouge orange des mâles sont dues à la présence de pigments caroténoïdes dans les téguments. Chez la rainette arboricole *H. arborea*, trois caroténoïdes ont été identifiés dans le sac vocal (Richardson et al., 2009). Par ailleurs, chez de nombreux oiseaux, comme le merle noir



(*Turdus merula*) ou le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) la couleur du bec des mâles est caroténoïde-dépendante (Baeta et al., 2008 ; Alonso-Alvarez et al., 2004, respectivement). Chez la frégate du pacifique (*Fregata minor*) les caroténoïdes ont été identifiés comme les principaux pigments responsables de la couleur rouge flamboyante de sa poche gulaire (Juola et al., 2008).

Durant ces dernières années, de plus en plus d'études soulignent la possible implication des caroténoïdes dans l'ICHH. En effet, l'élimination des pathogènes est souvent associée à la production de radicaux libres (ROS, *Reactive Oxygene Species*) qui conduisent à des dommages sur les tissus de l'organisme (ADN, lipides et protéines, Swindle et Metcalfe, 2007) et peuvent induire une réponse inflammatoire chez les vertébrés (Dowling et Simmons, 2009). Pour contrecarrer ces dégâts, l'organisme doit investir dans la production d'enzymes antioxydantes ou utiliser des défenses non-enzymatiques comme les vitamines ou les caroténoïdes. De ce fait, il existe chez les individus un compromis dans l'allocation des caroténoïdes, soit vers l'ornementation, soit vers l'immunité (Alonzo-alvarez et al., 2008). De par l'existence de ce compromis, les signaux sexuels colorés à base de caroténoïdes émis par les mâles peuvent être considérés par les femelles comme des signaux honnêtes, i.e. des indicateurs fiables de l'état sanitaires des individus (Hill, 1991 ; Grether, 2000 ; Velando et al., 2006). Chez le merle noir, Faivre et al., (2003) ont démontré qu'en provoquant un choc immunitaire, les becs des mâles exposés à l'antigène changeaient de couleur passant d'orange à jaune. Les individus qui investissent des caroténoïdes dans la signalisation sexuelle ne peuvent pas le faire sans les détourner de la réponse immunitaire et du système de détoxification des ROS (Lozano, 1994 ; Casagrande et al., 2007 ; McGraw et Ardia, 2007 ; Baeta et al., 2008 ; Mougeot, 2008). De nombreuses études chez les oiseaux montrent qu'une supplémentation en caroténoïdes augmente à la fois l'expression du signal visuel mais également les capacités immunitaires des mâles (McGraw et Ardia, 2003 ; Cucco et al., 2006 ; Costantini et al., 2007).

### 3) Comportement d'approvisionnement alimentaire

Le comportement participe à la communication entre les individus. D'un point de vue formel, les comportements sexuels, exprimés au moment de la reproduction sont une suite d'actions visant à assurer la fécondation de la femelle par le mâle. L'expression des comportements sexuels est influencée par un ensemble de facteurs externes (environnementaux et sociaux) et internes (physiologiques et génétiques) à l'animal (Ågmo, 1999). Bien que la prise alimentaire ne soit pas un comportement de reproduction, il peut apporter des bénéfices sur la *fitness* d'un individu de manière indirecte. En effet, si la

recherche alimentaire est un succès, les ressources obtenues peuvent être allouées à plusieurs grandes fonctions (survie, croissance et reproduction).

La recherche active de la ressource alimentaire est un comportement qui peut être coûteux en énergie. L'exemple le plus connu est celui des colibris qui, pour supporter le coup métabolique de leurs battements d'ailes à haute fréquence (environ 50 battements/sec), sont obligés de consommer plus d'une fois leur propre poids en nectar de fleur chaque jour, leur réserve énergétique ne leur permettant pas de survivre plus d'une heure à l'exercice (Suarez, 1992). L'individu doit choisir comment allouer son énergie. En effet, il y a un risque à investir de l'énergie dans la recherche alimentaire, surtout si la ressource est variable (Bednekoff, 1996 ; Chavez-Zichinelli et al., 2014), car cela réduit l'énergie qui sera disponible directement pour les autres fonctions comme la survie, la croissance ou la reproduction. Cependant, si la prise alimentaire est effective, alors la stratégie est payante (Peters, 2002).

La relation entre la prise alimentaire et le succès reproducteur a déjà été mise en évidence (exemple chez les guppys *Poecilia reticulata*, Boogert et al., 2010). Chez les animaux longévifs comme la vipère aspic (*Vipera aspis*), l'énergie obtenue par l'alimentation de la femelle des mois, voire des années, précédant la ponte affecte considérablement la taille et le nombre d'œufs fécondés (Bonnet et al., 2001). De même, chez les manchots de Humboldt (*Spheniscus humboldti*), le succès reproducteur est lié à l'efficacité de la chasse lorsqu'elle est rapportée à la distance parcourue, qui peut être de plusieurs centaines de kilomètres par an (Hennicke et Culik, 2005). Chez les insectes, il a été observé que les mâles ayant de meilleures aptitudes à trouver de la nourriture sont plus souvent choisis par les femelles car ils produisent un spermatophore plus gros (Belovsky et al., 2012).

#### *a) Approvisionnement alimentaire et production de signaux acoustiques*

Au moment de la reproduction, le temps que les mâles passent sur l'aire de reproduction à parader ou à chanter augmente leur succès reproducteur (Field et Klump, 2005). Chez les anoues, une grande majorité des études en milieu naturel a montré que le temps de présence et la participation au chœur sont déterminants pour le succès reproducteur des mâles, peu importe le système de reproduction de l'espèce (revue par Wells, 2007). Cependant, la durée de l'activité de chant dépend de la quantité de réserve énergétique du mâle. La production des sons émis par les mâles au moment de la reproduction augmente l'activité musculaire et les demandes en énergie (Prestwich, 1994 ; Gillooly et Ophir, 2010). Les coûts énergétiques de la production du son sont directement liés au métabolisme lors du fonctionnement des muscles (Grafe et Thein, 2001). Puisque le chant est clairement une



activité coûteuse chez beaucoup d'anoures, l'hypothèse la plus probable pour expliquer ce temps de présence dans le chœur est la contrainte énergétique associée au chant (Murphy, 1994). L'approvisionnement alimentaire peut bénéficier au mâle de manière directe, lui permettant un apport énergétique et substantiel suffisant pour supporter les coûts de l'expression des signaux sexuels acoustiques. Plusieurs études supportent cette hypothèse, montrant une diminution des réserves énergétiques au cours de la saison de reproduction (MacNally, 1981) et même au cours d'une nuit de chant (Bevier, 1997), suggérant que la présence sur le chœur est limitée par la quantité de réserve énergétique et/ou la capacité de dépenser cette énergie de manière efficace (Brepson et al., 2013). Puisque les mâles ne chassent pas sur le site de reproduction, les activités de chant et de chasse s'alternent au cours de la saison de reproduction. La recherche alimentaire est également un comportement coûteux en termes de temps. Il existe donc un compromis entre le temps passé à parader et le temps passé à chasser (Abrahams, 1993). Les bons mâles sont alors ceux qui chassent efficacement et rapidement tout en maximisant le temps de parade (ou de chant) qui permet d'augmenter leur succès reproducteur.

Toutefois, les études essayant de manipuler expérimentalement la contrainte énergétique (par le jeûne ou le gavage) chez les anoures ont obtenu des résultats contradictoires. En effet, un gavage peut augmenter le temps de présence des mâles sur le chœur (Murphy, 1994) ou pas (Meuche et Grafe, 2009), augmenter le nombre de chant (Grafe, 1996 ; Marler et Ryan, 1996 ; Meuche et Grafe, 2009) ou pas (Green, 1990). Par ailleurs, d'après l'hypothèse de Castellano (2009), les mâles de différentes conditions devraient avoir des stratégies de reproduction différentes pour faire face aux contraintes imposées par la restriction calorique. Brepson et al. (2013) ont en effet montré que les gros mâles *H. arborea* réduisaient la qualité de leur chant alors que les petits mâles diminuaient plutôt la quantité de leur chant lorsqu'ils étaient à jeun.

#### *b) Approvisionnement alimentaire et production de signaux visuels*

Parmi les pigments utilisés par les animaux, les caroténoïdes présentent la particularité de ne pas être synthétisables *de novo* (Olson et Owens, 1998). De fait, ils sont contraints de les puiser dans leur alimentation. Dans le cas où les ressources nécessaires au développement de l'ornement sont limitées, les coûts associés à l'ornementation (compromis d'allocation avec d'autres fonctions, comme la fonction immunitaire) peuvent limiter son élaboration (McGraw et al., 2005). En choisissant son partenaire sur ce type de signaux coûteux, la femelle peut obtenir des bénéfices indirects permettant à sa progéniture d'être attractive à son tour. La femelle peut également obtenir des bénéfices directs si la couleur élaborée par le

mâle reflète sa performance reproductive ou est directement liée aux ressources sur un territoire (Kokko et al., 2006, Karino et al., 2007 ; McGraw et Hill, 2001). Les colorations tégumentaires à base de caroténoïdes sont considérées comme des indicateurs fiables de la capacité des individus à rechercher de la nourriture riche en caroténoïdes. Karino et al. (2007) ont montré chez les guppys (*P. reticulata*) que la coloration des mâles était liée à leur capacité à discriminer des algues riches et pauvres en caroténoïdes pour leur alimentation.

### **III / Effets de la testostérone sur la signalisation sexuelle**

#### **1) Testostérone et signaux acoustiques**

Le rôle de la testostérone sur l'expression des signaux sexuels acoustiques a été très étudié chez les oiseaux (exemples Galeotti et al., 1997 ; Maddison et al., 2012). Chez les passereaux mâles bruant chanteur (*Melospiza melodia*), les structures du chant varient au cours des saisons et sont temporellement corrélées avec les concentrations de testostérone mesurées dans le plasma (Smith et al., 1997). La testostérone peut moduler les vocalisations *via* son action sur les centres motivationnels et le système nerveux central (Kelley, 2004) ou par des modifications sur les structures périphériques impliquées dans la production du signal. Par exemple, des changements dans la fréquence fondamentale résultent des effets anabolisants des androgènes sur le larynx et le pharynx (Beani, 1995 ; Evans et al., 2008 ; Pasch et al., 2011). En modifiant la durée, la cadence ou la fréquence fondamentale des chants, la testostérone permet un lien mécanique entre les structures physiologiques et la forme du signal reconnu par le récepteur.

La testostérone peut avoir des effets sur les muscles responsables du chant. Chez des poissons (*Porichthys notatus*), la mise en place d'implant de testostérone chez les mâles en dehors de la saison de reproduction augmente la masse et l'épaisseur transversale des muscles responsables du chant (Brantley et al., 1993). Chez les anoues, Girgenrath et Marsh (2003) ont démontré que les propriétés contractiles des muscles obliques du tronc sont modifiées par la testostérone. Chez la rainette criarde (*Hyla chrysoscelis*), les muscles obliques des mâles après la saison de reproduction ont une plus faible proportion de fibres à contraction rapide (forte puissance mais faible endurance) par rapport aux fibres à contraction lente (faible puissance mais forte endurance, Girgenrath et Marsh, 2003). Les mâles en post-saison de reproduction et les femelles ayant reçu un implant de testostérone ont des masses et des propriétés contractiles des muscles similaires à celles observées chez des mâles en pleine période de reproduction (Girgenrath et Marsh, 2003).

Enfin, au niveau cellulaire, peu de chose est connu sur l'effet de la testostérone sur la bioénergétique des muscles du chant. Néanmoins, l'administration de testostérone potentialise les augmentations induites par l'exercice musculaire sur le fonctionnement du cytochrome *c* oxydase (le complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) dans les muscles cardiaques et soléaires (face postérieure de la jambe) chez les rats (Van Breda et al., 1992). De plus, chez des rats castrés, la testostérone augmente l'activité spécifique de plusieurs enzymes mitochondriales telles que la succinate déshydrogénase, la glycérol phosphate déshydrogénase ou encore la pyruvate carboxylase (Brooks, 1979). Ces enzymes sont connues pour coordonner les différentes voies qui mènent à l'augmentation de la biogenèse des mitochondries (revue par Traish et al., 2011). De fait, l'augmentation des niveaux de testostérone au moment de la saison de reproduction pourrait avoir des effets sur la biomécanique des muscles. En améliorant l'efficacité mitochondriale, la production d'ATP pourrait être optimisée et utilisée pour l'effort musculaire important associé à la production de chant à cette période. Les effets intégrés de la testostérone sur plusieurs niveaux physiologiques (biomécanique des muscles, bioénergétique de la mitochondrie) pourraient permettre de comprendre les mécanismes qui sous-tendent et modulent l'expression des signaux acoustiques émis par les mâles au moment de la saison de reproduction dans le but d'attirer les femelles.

## 2) Testostérone et signaux visuels

Chez de nombreuses espèces, la testostérone régule l'expression des signaux colorés, qu'ils soient caroténoïde-dépendants ou non. Une expérience très complète chez le lézard *Sceloporus undulatus* a montré que, chez les juvéniles, le développement du dimorphisme sexuel (coloration ventrale de patches bleus et noirs) est parallèle et similaire à la différence en testostérone plasmatique entre les deux sexes, ce qui suggère une relation fonctionnelle de la testostérone sur la couleur du ventre (Cox et al., 2005). Les auteurs de cette étude ont aussi démontré que la castration de jeunes mâles inhibait le développement de la couleur ventrale bleutée spécifique des mâles adultes, qu'un apport de testostérone exogène restaurait l'expression de cette couleur chez les mâles juvéniles castrés et qu'un apport de testostérone exogène chez les femelles juvéniles augmentait le développement de la coloration ventrale bleutée pourtant mâle spécifique (Cox et al., 2005). De la même façon, bien que chez les oiseaux l'effet de la testostérone sur la couleur des plumes soit contraint par la mue des individus, Karubian et al., (2011) ont pu observer chez les mâles mérions à dos rouge (*Malurus melanocephalus*) que lorsqu'ils devenaient reproducteurs leur taux de testostérone augmentait, la repousse des plumes arrachées était plus rouge et la couleur de leur bec

augmentait aussi rapidement. Chez cette espèce, les deux signaux visuels (bec et plumes) sont caroténoïde-dépendants (Karubian et al., 2011).

De plus, il a été suggéré que la testostérone pourrait jouer un rôle dans la régulation du compromis entre l'investissement des caroténoïdes dans la signalisation visuelle et dans la maintenance du système immunitaire (Alonso-Alvarez et al., 2008). En effet, Blas et al. (2006) argumentent le fait que les effets des caroténoïdes et de la testostérone sur les fonctions d'ornementation doivent être étudiés ensemble et en interaction. Ces auteurs ont montré qu'une manipulation des taux de testostérone augmentait la biodisponibilité en caroténoïdes dans le plasma responsable du signal coloré chez la perdrix rouge (*Alectoris rufa*). Alors, l'effet immunosuppresseur de la testostérone pourrait être tamponné par la capacité des caroténoïdes à stimuler le système immunitaire (Blas et al., 2006). En 2005, McGraw et Ardia montrent qu'une élévation en caroténoïde dans le plasma améliore les réponses immunitaires humorales et cellulaires chez le mâle diamant mandarin (*T. guttata*). Deux ans plus tard, ils observent qu'une élévation du taux de testostérone peut avoir des effets immuno-stimulateurs en diminuant les caroténoïdes disponibles pour la couleur afin d'améliorer les performances immunitaires (McGraw et Ardia, 2007). Ainsi, seuls les mâles avec un fort taux de testostérone capables à la fois d'exprimer des signaux sexuels caroténoïde-dépendants attractifs et de contribuer aux besoins en caroténoïdes pour la fonction antioxydante sont-ils considérés comme des bons mâles.

### 3) Testostérone et comportement d'approvisionnement alimentaire

La recherche alimentaire requiert certaines compétences cognitives plus ou moins développées selon les espèces et le type d'aliment recherché (végétaux, proies mobiles/immobiles ; Neave, 2008). Les effets de la testostérone sur les fonctions cognitives ont été très étudiés chez le rat et les oiseaux (voir la méta-analyse par Pfannkuche et al., 2009). Par exemple, chez la perdrix grise (*Perdrix perdrix*) la testostérone augmente le temps de vigilance de l'animal à son environnement (Fusani et al., 1997). D'autres études réalisées sur les primates non-humains montrent des résultats intéressants. Par exemple, chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*), la testostérone améliore les performances de mémoire à reconnaissance visuelle, peu importe la durée du stimulus (Lacreuse et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la testostérone augmente la vigilance des individus. Également, chez les chimpanzés communs mâles (*Pan troglodytes*) de hauts taux de testostérone sont corrélés avec de meilleures performances cognitives notamment dans les repères spatiaux (Wobber et Herrmann, 2014).

Le comportement de recherche alimentaire peut également être modulé par la testostérone. Chez le colibri à oreilles blanches (*Hylocharis leucotis*), une étude récente montre que malgré un vol extrêmement coûteux, les individus avec un fort taux de testostérone vont butiner plus de fois les tableaux de fleurs où les récompenses sont variables, ce qui est un comportement dit plus risqué (Chavez-Zichinelli et al., 2014). Ces résultats suggèrent une modification de la personnalité de l'oiseau dans son type de comportement (plus risqué) par la testostérone.

#### **IV / Immunocompétence et testostérone**

En plus des effets sur la régulation de l'expression des traits sexuels secondaires de manière directe (sur le chant et la couleur par exemple) ou de manière indirecte (sur les capacités d'approvisionnement alimentaire par exemple), la testostérone a un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire des individus. Bien que le système immunitaire soit complexe et que les composantes intrinsèques et génétiques du système immunitaire ne soient pas à exclure (encadré 3), de nombreuses données démontrent le rôle important des hormones sexuelles dans la modulation de la réponse immunitaire.

Les différents effets moléculaires et cellulaires de la testostérone sur le système immunitaire ont fait l'objet d'une récente revue par Trigunaite et al. (2015). Les différences de sensibilités immunitaires entre les sexes suggèrent fortement un rôle des androgènes dans la régulation de la réponse immunitaire (Zuk et McKean, 1996 ; Klein et al., 1997 ; Fargallo et al., 2007). Chez l'homme, dans les maladies auto-immunes où le système immunitaire devient généralement hyperactif, 75% des patients sont des femmes ; alors que dans le cas des cancers, où le système immunitaire ne parvient pas à combattre les cellules cancéreuses, le ratio hommes : femmes est de 1.33, même lorsque les cancers sexes spécifiques sont exclus (revue par Trigunaite et al., 2015). Ces chiffres sont une première indication de l'effet immunosuppresseur de la testostérone. Chez des souris (*Mus musculus*) mâles castrés, i.e. androgène déficients, les macrophages expriment davantage les récepteurs de surface TLR4 (Toll Like Receptor 4) qui permettent la reconnaissance des molécules du non-soi (Rettew et al., 2008). Cette surexpression est réversible lors d'une supplémentation en testostérone (Rettew et al., 2008). Le thymus est l'organe spécialisé dans la maturation des lymphocytes dans lequel les cellules T d'origine médullaire subissent une différenciation cellulaire ainsi que l'acquisition de récepteurs spécifiques. Les effets de la castration et de la puberté sur le thymus révèlent une régulation négative de la testostérone dans le développement des cellules T impliquées dans la réponse immunitaire humorale (Heng et al., 2005). En effet, la suppression des androgènes par castration chez les mâles augmente la taille du thymus et la

prolifération cellulaire et diminue l'apoptose des cellules T (Heng et al., 2005). Par conséquent, la testostérone réduit l'exportation de cellules T dans le système sanguin et, donc, leur action. L'ensemble de ces résultats démontre un effet immunosuppresseur de la testostérone.

### Encadré 3 : le système immunitaire chez les vertébrés

On appelle réponse immunitaire l'activation des mécanismes du système immunitaire face à la reconnaissance du « non-soi », face à une agression infectieuse ou à une dysfonction de l'organisme. Chez les vertébrés, il existe deux grands types de système de défense immunitaire : 1) les mécanismes de défense non-spécifique (ou innée), 2) les mécanismes de défense spécifique (ou acquise).

**L'immunité innée** s'exprime toujours de la même manière et ne conserve pas de mémoire. C'est la première ligne de défense naturelle et polyvalente. Elle existe avant tout contact avec l'agent infectieux : sa mise en œuvre est immédiate, spontanée et rapide dès l'intrusion d'un élément étranger dans l'organisme et quel que soit le type d'agresseur (virus, bactérie, parasite).

**L'immunité acquise** utilise les mécanismes de reconnaissance spécifique de l'élément étranger. De plus, elle se distingue de l'immunité innée par sa faculté à conserver en mémoire le souvenir d'une première agression. En effet, une agression ultérieure par le même agent infectieux entraînera une réponse immunitaire plus rapide et plus efficace. Elle peut être à **médiation humorale** (les anticorps) et/ou à **médiation cellulaire** (les lymphocytes, voir Figure 4). Les acteurs principaux de cette défense spécifique sont les lymphocytes B et T.

Les neutrophiles et les monocytes (macrophages) sont les premières cellules à répondre aux infections (réponse innée). Ils sont formés au niveau de la moelle épinière. Les neutrophiles et les monocytes matures sont relâchés dans le sang avant d'être appelés sur les sites d'infection. Ce sont des cellules phagocytaires produisant des cytokines pro-inflammatoires et entraînant une réaction inflammatoire (revue par Trigunaite et al., 2015).

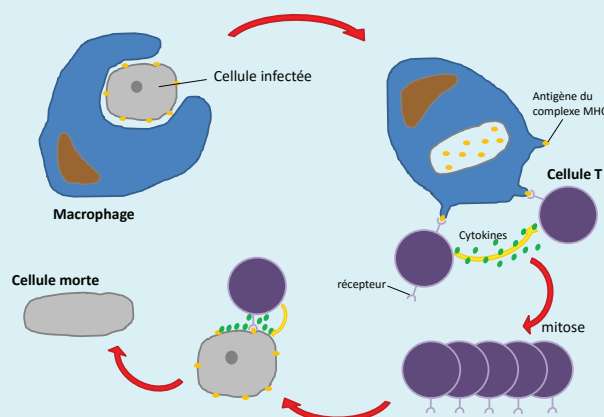


Figure 4 : mécanisme simplifié de la réponse immunitaire à médiation cellulaire.

En immuno-écologie, la réponse immunitaire peut se mesurer selon plusieurs méthodes (Boughton et al., 2011). Une injection de phytohaemagglutinine (**PHA**, une lectine trouvée dans les plantes et utilisée comme mitogène) entraîne une réaction inflammatoire ciblée et mesurable à l'aide d'un spécimètre de précision alors qu'une injection de globules rouges de mouton (**SRBC**) active une réponse immunitaire humorale mesurable par comptage des anticorps développés dans le sang.

Le terme 'immunocompétence' définit la capacité à produire des anti-parasites ou une réponse immunitaire anti-antigène ; c'est un caractère 0/1. Alors que l'amplitude d'une réponse immunitaire particulière est un caractère quantitatif continu (Vinkler et al. 2011).

Une étude menée par Edler et al. (2011), montre qu'une injection de PHA chez des individus supplémentés en testostérone réduit la réponse inflammatoire mesurée, par rapport aux individus témoins. Une seconde injection de PHA chez les mâles supplémentés en

testostérone quatre semaines plus tard ne provoque pas une augmentation de la réponse immunitaire au niveau de celle enregistrée chez les individus témoins qui ont un niveau de testostérone plus bas. Ce résultat indique que le traitement à la testostérone pourrait directement ou indirectement supprimer certains composants de la réponse immunitaire acquise. Cette étude confirme l'immunosuppression de la testostérone à la fois pour la réponse immunitaire innée (une injection), mais aussi acquise (deux injections). Une augmentation expérimentale des taux de testostérone *in ovo* a montré une suppression de la réponse innée et de la réponse acquise chez le troglodyte familial (*Troglodytes aedon*) et mène à une diminution de la réponse antibactérienne chez les oisillons provenant d'œufs traités à la testostérone (Clairardin et al., 2011).

Cependant, le rôle immunosuppresseur de la testostérone est mis en doute par certaines études. Dans la méta-analyse effectuée sur 22 études par Roberts et al. (2004), les liens de causalité entre un taux élevé de testostérone et l'immunosuppression existent. Cependant, les auteurs notent que ces effets disparaissent lorsqu'ils prennent en compte la non-indépendance des données. Par ailleurs, bien que Buchanan et al. (2003a) aient trouvé un effet immunosuppresseur de la testostérone sur la réponse humorale suite à une injection de SRBC (voir encadré 3) chez le moineau domestique (*Passer domesticus*), la manipulation hormonale n'a eu aucun effet sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire suite à l'injection de PHA. Evans et al. (2000) trouvent surprenant que la production d'anticorps suite à un choc immunitaire chez des mâles castrés ou supplémentés en testostérone de cette même espèce soit basse pour les deux groupes.

## **VI / Objectifs et hypothèses**

L'objectif de cette thèse a été de définir le rôle de la testostérone sur l'honnêteté des signaux sexuels dans un contexte de communication multimodale. J'ai travaillé sur l'évolution de la signalisation (ICHH, honnêteté des signaux), au niveau de l'organisme (comportement de chasse), au niveau des tissus (fonctionnement musculaire et flux de caroténoïdes) et enfin au niveau cellulaire (bioénergétique).

Dans un premier temps, nous avons testé l'hypothèse du handicap immunitaire proposé par Folstad et Karter (1992) chez un amphibien, la rainette arboricole *Hyla arborea*. Dans un second temps, par une approche intégrative, nous avons testé la relation entre les performances de chant et les effets de la testostérone sur la biomécanique de contraction musculaire des muscles du tronc et la bioénergétique des mitochondries des fibres musculaires. Ensuite, nous avons cherché à identifier la relation entre le signal coloré et la biodisponibilité des caroténoïdes présents dans l'organisme selon l'hypothèse de Blas et al.



(2006). Enfin, nous avons étudié l'effet de la testostérone sur le comportement d'approvisionnement alimentaire, nécessaire à l'apport énergétique pour le chant et l'apport en caroténoïdes pour la couleur.

Les différentes hypothèses sont :

- H1.a : le signal visuel est testostérone-dépendant,
- H1.b : le signal acoustique est testostérone-dépendant,
- H1.c : la testostérone est immunosuppressive.
- H2.a : les propriétés contractiles des muscles et le fonctionnement mitochondrial sont améliorés par la testostérone,
- H2.b : les caractéristiques de chants sont associées à des performances (force et fatigue) des contractions musculaires,
- H2.c : les propriétés contractiles musculaires sont liées au fonctionnement mitochondrial des fibres musculaires.
- H3.a : la quantité de caroténoïdes dans le sac vocal est responsable de la couleur du sac vocal,
- H3.b : la testostérone modifie la répartition des caroténoïdes entre le foie (organe de stockage) vers le sac vocal pour la fonction ornementale.
- H4.a : la testostérone améliore la vigilance en diminuant le temps de latence avant la première attaque.
- H4.b : la testostérone permet aux mâles d'avoir des attaques plus rapides.
- H4.c : la testostérone augmente le succès d'attaque des mâles.

## **VII / Modèle biologique**

*Hyla arborea*, la rainette arboricole ou rainette verte est un amphibien de petite taille (entre 3 et 6 cm), reconnaissable à la longue bande latérale sombre qui part des narines et se prolonge sur les flancs (Figure 5). C'est une espèce largement répartie en France, excepté dans le sud de la France où l'on retrouve principalement la rainette méridionale (*Hyla meridionalis*). Son activité est principalement nocturne ou crépusculaire. Dans la journée, l'activité de la rainette est fortement réduite, elle peut rester immobile plusieurs heures durant sous une source de chaleur. La rainette verte est une espèce patrimoniale en Rhône-Alpes. Elle figure sur la liste rouge mondiale et Européenne de l'UICN et la liste de rouge des amphibiens de France métropolitaine. À ce titre sa manipulation est réglementée au niveau communautaire par l'annexe IV de la directive 92/43/CEE (directive européenne, dite directive habitats-faune-flore) et au niveau national par l'article 2 de l'arrêté du 19 novembre 2007 fixant la liste des amphibiens et des reptiles protégés sur l'ensemble du territoire



français et les modalités de leur protection. Son statut de protection international est mentionné par la convention relative à la conservation de la vie sauvage et du milieu naturel de l'Europe (Convention de Berne) dans l'annexe II et III.

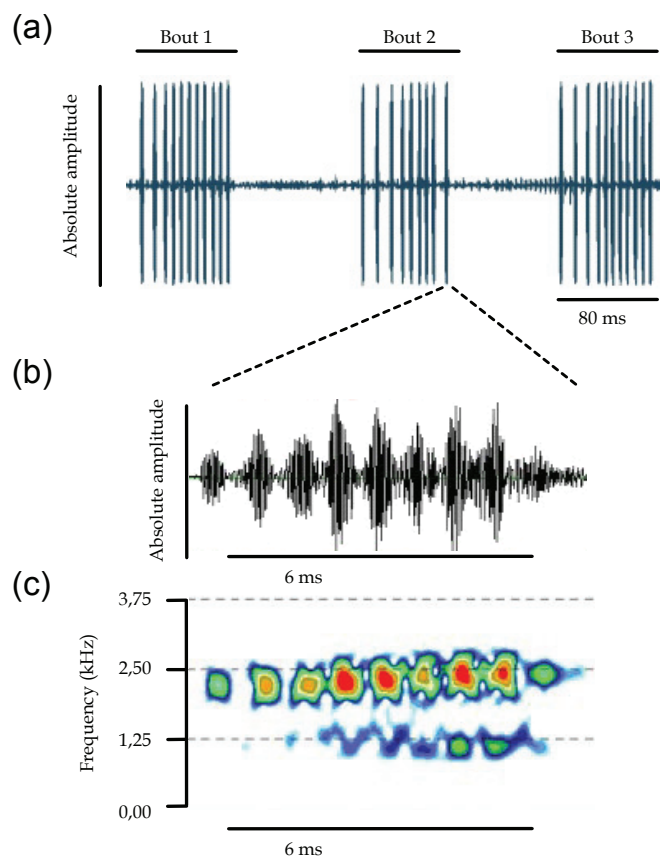


**Figure 5 : Mâle *H. arborea* exposant à la fois le signal acoustique et visuel par les vocalises et la couleur du sac vocal.** Photo de J. Desprat, 2014.

Au moment de la reproduction qui s'étend d'avril à juin dans la région Rhône-Alpes, les mâles se regroupent sur le site de reproduction et forment un chœur pouvant rassembler plusieurs centaines d'individus afin d'attirer les femelles (Friedl et Klump, 1997). Ce système d'appariement peut être considéré comme un lek. Bradbury (1981) propose quatre critères pour définir un lek : 1) les mâles n'offrent pas de soins parentaux, ils n'apportent aucun bénéfice direct aux femelles et ne contribuent aux générations futures que par leur sperme, 2) les mâles se rassemblent dans une aire, où les femelles viennent uniquement pour la reproduction. Cette aire n'est utilisée pour aucune autre activité au cours de l'année, 3) le site que les mâles défendent ne contient pas de ressources particulières qui pourraient attirer les femelles, à part les mâles eux-mêmes, et enfin 4) les femelles ont l'opportunité de sélectionner leur partenaire quand elle visite le lek. Le lek est donc le système idéal pour étudier les signaux sexuels car il permet de se soustraire à tous les choix faits par les femelles sur des bénéfices directs (nourriture, territoire...). Chez *H. arborea*, il existe une forte différence inter-individuelle dans le succès reproducteur des mâles en raison des choix de la femelle et/ou de la compétition mâle-mâle (Jaquiery et al., 2010). Les femelles ne peuvent pas accéder directement à la qualité génétique des mâles et leur choix va donc être basé sur des signaux qui reflètent honnêtement cette qualité.

Chez *H. arborea*, de précédentes études au sein du laboratoire ont permis de mettre en évidence les préférences des femelles selon des critères multimodaux, acoustiques et visuels (Richardson et al., 2010a ; Gomez et al., 2010). Les femelles comparent les performances de chants des mâles avant l'accouplement (Richardson et al., 2010b). Les femelles présentent

une préférence pour des chants plus puissants, plus graves et plus rapides (Richardson et al., 2010b, Richardson et Lengagne, 2010). En moyenne, un mâle produit 15 000 chants par nuits (Brepson et al., 2013). Les mâles produisent des chants en séries appelés bouts qui contiennent 25 chants et durent 4 secondes en moyenne (Brepson et al., 2013, Figure 6).

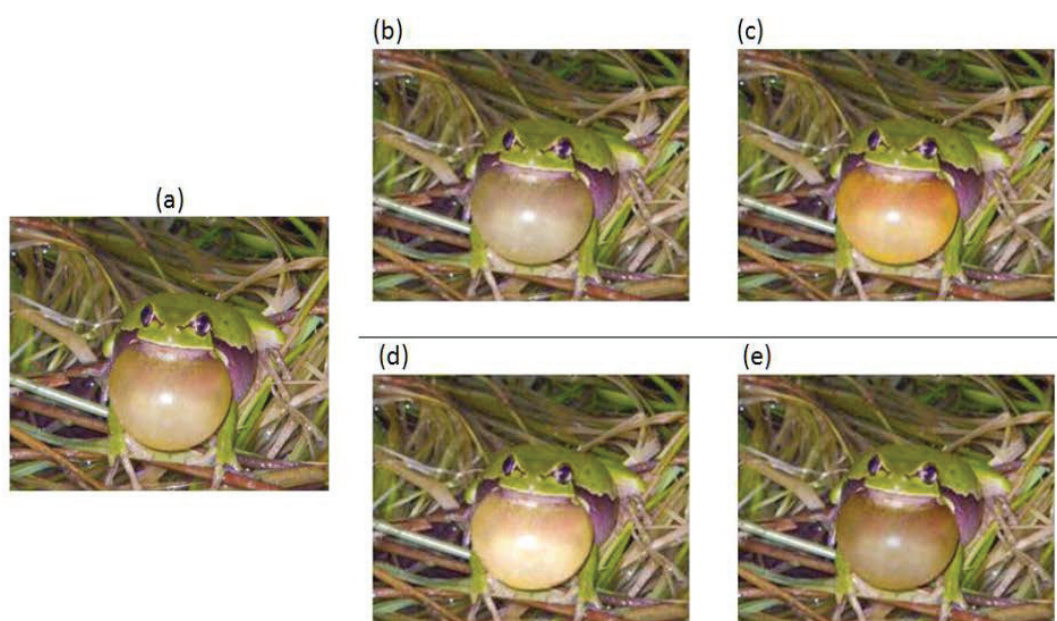


**Figure 6 :** Caractéristiques spectro-temporelles du signal acoustique des mâles chez *H. arborea*. (a) Oscillogramme de 3 bouts contenant une série de chants ; (b) oscillogramme et (c) sonagramme d'un chant isolé permettant de visualiser l'intensité énergétique portée par chaque pulse du chant selon un gradient de couleur (couleurs froides = intensités faibles, couleurs chaudes = intensités fortes). Figure obtenue d'après la thèse de N. Richardson, 2010.

La vitesse d'émission des chants dans un bout (Vitesse Intra-Bout, VIB) est très élevée avec une fréquence de 5 à 9 chants/seconde (Gomez et al., 2011). Chaque chant est composé de deux pics de fréquences, un premier compris entre 1 et 2 kHz et un second plus important compris entre 2 et 3 kHz. Ainsi, la fréquence dominante – la fréquence avec la plus grande énergie - du chant est-elle comprise entre 2 et 3 kHz chez *H. arborea*. Souvent associée à la condition physique des mâles (Gingras et al. 2013), la fréquence du chant est un indicateur honnête de la taille des mâles (Gomez et al., 2011). Les paramètres du chant tels que la vitesse d'émission, la puissance d'émission ou la durée des chants sont des indicateurs de la condition énergétique des mâles chez d'autres espèces (Grafe, 1996 ; Briggs, 2010).

La couleur du sac vocal est également un critère de sélection chez cette espèce. À travers deux expériences utilisant des modèles non animés de mâles, Gomez et al. (2010) ont

mis en évidence les préférences de la femelle à la fois sur des critères de clarté mais également sur la saturation en couleur du sac vocal (Figure 7). À qualité de chant égale, des individus avec des sacs vocaux plus colorés (plus rouge qu'orange) et plus foncés seront préférentiellement choisis par les femelles. La clarté et la saturation en couleur sont relativement plastiques (thèse Brepson 2012, résultats non publiés) mais ne semblent pas avoir de lien avec la condition corporelle des mâles (Gomez et al., 2011). Les premières analyses chimiques réalisées par Richardson et al. (2009) sur les sacs vocaux des mâles *H. arborea* ont permis de mettre en évidence la présence de pigments caroténoïdes dans le tégument. De par la double fonction des caroténoïdes dans le signal visuel et dans la fonction immunitaire, les signaux caroténoïde-dépendants peuvent être considérés des signaux honnêtes.



**Figure 7 : Caractéristiques la couleur du sac vocal des mâles *H. arborea*.** (a) mâle ayant un sac vocal avec une saturation et une clarté moyenne ; (b) mâle ayant un sac vocal de faible saturation ; (c) mâle ayant un sac vocal avec une saturation élevée ; (d) mâle ayant un sac vocal clair ; (e) mâle ayant un sac vocal foncé. *Figure obtenue d'après la thèse de M. Troïanowski, 2014.*

*H. arborea* est donc un modèle biologique pertinent permettant de mesurer les effets de la testostérone dans un contexte de multimodalité, à la fois sur les paramètres acoustiques mais également sur les paramètres de la couleur, d'un point de vue physiologique et comportemental.

## PRÉSENTATION DES ARTICLES

- [1] Josserand R., Brepson L., **Desprat J.L.**, Lengagne T., Mondy N. (2015) A phytohaemagglutinin challenge test to assess immunocompetence of European tree frog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia*, 36 (2) : 111-118. doi : 10.1163/15685381-00002983
- [2] **Desprat J.L.**, Lengagne T., Dumet A., Desouhant E., Mondy N. (2015). Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog : trade-off between sexual signals and immunity ? *Behavioural Ecology*, 26 (4) : 1138-1146. doi : 10.1093/beheco/arv057
- [3] **Desprat J.L.**, Teulier L., Puijalon S., Romestaing C., Dumet A., Lengagne T., Mondy N. Caloric restriction and testosterone affect mitochondrial functioning and contractile properties of calling muscles in *Hyla arborea*. *Journal of experimental biology*, soumis septembre 2015
- [4] **Desprat J.L.**, Bellvert F., Lengagne T., Mondy N. Couleur du sac vocal et effet de la testosterone sur les flux de caroténoïdes ? *Article en préparation*.
- [5] **Desprat J.L.**, Mondy N. and Lengagne T. Foraging behavior and testosterone: supplemented males are better hunters. *Animal Behaviour*, soumission prévue novembre 2015



## **Article 1 : A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog *Hyla arborea***

Josserand R., Troïanowski M., Grolet O., **Desprat J.L.**, Lengagne T., Mondy N.  
*Amphibia-Reptilia*, 36 (2015), 111-118.

### **Problématique :**

Évaluer le potentiel immunitaire de population en condition naturelle est une préoccupation centrale en écologie et en biologie de la conservation. Pour mesurer l'immunocompétence d'un organisme (la capacité d'un organisme à produire une réponse immunitaire normale) plusieurs techniques sont utilisées. Elles nécessitent souvent un prélèvement de sang (mesure de la capacité bactéricide du plasma, détermination des profils de leucocyte présents...). Parmi les rares méthodes non-invasives connues le test PHA (mesure du gonflement cutané suite à une injection de phytohaemagglutinine) est très utilisé, en particulier pour des modèles oiseaux. Le type de réponse immunitaire (humorale ou à médiation cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T) intervenant dans la réponse au test de la PHA fait cependant débat dans la littérature. De récentes études suggèrent que ce test permet de mesurer, d'une part, une réponse inflammatoire rapide et non-spécifique liée au recrutement de macrophages (réponse adaptative) et d'autre part, une réponse innée.

### **Objectifs :**

Cette étude est nécessaire pour préciser les conditions optimales d'utilisation (dose injectée et temps de réaction) du test de PHA chez *H. arborea* et valider le type de réponse immunitaire associée à la réaction du test PHA.

### **Méthodes :**

Expérimentation 1 : Afin de déterminer la dose optimale à injecter et le temps de réaction du test PHA, nous avons injecté 0.25 mg, 0.5 mg ou 1 mg de PHA dans le muscle de la patte droite de 9 individus et comparé l'inflammation 0, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 heures après l'injection par rapport à la patte gauche injectée avec du sérum physiologique (PBS).

Expérimentation 2 : Alors que 22 mâles sont injectés avec du PBS, 67 autres sont injectés avec 0.5 mg de PHA. La variation d'épaisseur de la patte (après – avant injection) à 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 heures de chaque mâle permet d'évaluer la variabilité de réponse inter-individuelle et de valider l'utilisation de cette méthode chez *H. arborea*.

Expérimentation 3 : Afin de mieux comprendre la nature de la réponse immunitaire dans la réaction au test PHA, 6 mâles témoins sont injectés une fois avec de la PHA et 5 mâles sont injectés deux fois à 10 jours d'intervalle. La réaction inflammatoire est mesurée 16

heures après l'injection, puis les mâles sont euthanasiés afin de faire un prélèvement sanguin qui est analysé après une coloration May Grunwald-Giemsa.

#### **Résultats :**

- 0.5 mg de PHA par injection est nécessaire et suffisant pour provoquer une inflammation significative de l'épaisseur de la patte. Ce gonflement est maximal à partir de 12 h et reste stable pendant 24 heures. L'inflammation est réversible en 48 heures.
- Il existe une variation de réponse à la PHA entre les mâles mesurable dès 14 h après l'injection.
- Après une seconde injection de PHA, la réaction inflammatoire est 150% plus importante que la première. La réaction inflammatoire est positivement reliée au nombre total de globules blanc comptés dans le plasma.

#### **Conclusion :**

Le test PHA est utilisable chez *H. arborea* pour mesurer son potentiel immunitaire. Le gonflement de la pâte observé est bien dû à la présence de lymphocyte en nombre au site d'injection. Le nombre de lymphocytes mesuré après deux injections est plus élevé que celui enregistré après une seule injection. La mise au point de la méthode d'utilisation du test PHA chez *H. arborea* est un prérequis indispensable pour tester l'hypothèse du handicap immunitaire dans l'article 2 de cette thèse.



## A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog *Hyla arborea*

Rémy Josserand, Mathieu Troïanowski, Odile Grolet, Julia L. Desprat,  
Thierry Lengagne, Nathalie Mondy\*

**Abstract.** Immune responsiveness, one measure of individual quality, can be used as a sensitive, non-lethal variable that may be negatively affected in animals exposed to degraded, contaminated or otherwise disturbed areas. One frequently used technique to measure immune responsiveness is the phytohaemagglutinin (PHA) challenge test. Swelling occurring at the injection sites are measured before and 24 h after PHA injection. The immune response is considered to be the difference between the two measures. Although this method is easily performed with wild animals, it has been rarely used on small amphibians. Here, we test the possibility of using a PHA test with the European tree frog, *Hyla arborea*, and we identify the optimal procedure for measuring immune responsiveness in this species. The results allowed us to simplify the procedure in eliminating phosphate-buffered saline (PBS) injection and reducing the duration of the experiment. Injection of PHA into the leg of *H. arborea* triggered an immune response with a peak of swelling 14 h after injection. A second injection of PHA into the same animal induced more intense leg swelling. In addition, haematological responses showed that the total number of leucocytes increased after PHA injection. A link between the leg swelling and the total leucocytes count recorded in blood has been found. Consequently, this method may provide a useful tool for predicting the pro-inflammatory capacity of field populations of small amphibians.

**Keywords:** conservation, immune system, PHA, pro-inflammatory capacity, tree frog.

### Introduction

The capacity of an individual to produce an appropriate immune response following exposure to a pathogen is a critical aspect of disease resistance and survival (Demas et al., 2011). Although habitat destruction, chemical pollution exposure, and introduction of predators/competitors are obvious causes of amphibian declines, there is now compelling evidence for mass deaths among amphibian populations in diverse geographic locations due to disease outbreaks (Carey, Cohen and Rollins-Smith, 1999). The amphibian immune system involves both innate and adaptive defence mechanisms. The innate immunity system provides rapid and non-specific protection. During this phase, resistance mechanisms recognise an external pathogen via broadly conserved molec-

ular structures and then respond to it (Boughton, Joop and Armitage, 2011). In contrast, an adaptive immune response is characterised by specific memory that allows an individual to recognise and remember specific pathogens and will often provide lifetime immunity against reinfection with the same pathogen (Carey, Cohen and Rollins-Smith, 1999). The adaptive immune response includes humoral immunity through the production of highly specific antibodies and cell-mediated responses which involve T lymphocytes and then macrophages and polynuclear leucocytes (Gilbertson et al., 2003). Constitutive immunity provides a response that is always ready to act; it tends to be a rapid response and is unspecific in that it is elicited or effective against a variety of immune challenges (Boughton, Joop and Armitage, 2011). In contrast induced responses are only expressed after pathogen infection, wounding, cancer recognition, allergies and immunopathologies. These activities encompass both innate and adaptive immunity. Because of the complexity of the physiological reactions triggered by infection,

---

Université de Lyon, 69000 Lyon, France and Université Lyon 1, UMR CNRS 5023, 69622 Villeurbanne, France

\*Corresponding author;

e-mail: nathalie.mondy@univ-lyon1.fr



**Table 1.** Literature overview of studies using PHA to measure immune responsiveness in amphibian species.

| Species <sup>(1)</sup>          | Stage   | Method  | Reference                      |
|---------------------------------|---------|---|--------------------------------|
| <i>Lithobates pipiens</i>       | Adult   | Toe web injection, 2 mg/ml, swelling measure at 24, 48, and 72 h                  | Gilbertson et al., 2003        |
| <i>Lithobates spinocephalus</i> | Tadpole | Tail injection, 1 mg/ml, swelling measure at 24 h                                 | Venesky et al., 2012           |
| <i>Rana sylvatica</i>           | Froglet | Thigh injection, 1 mg/ml, swelling measure at 24 h                                | Gervasi and Foufopoulos, 2008  |
| <i>Rhinella marina</i>          | Adult   | Toe web injection, 1, 2, and 5 mg/ml, swelling measure at 6, 12, 24, 48, and 72 h | Brown, Shilton and Shine, 2011 |

<sup>(1)</sup> Many studies not mentioned in the table use PHA with spleen cell culture of *Xenopus leavis* (e.g., Kinney and Cohen, 2005).

measuring and interpreting immune responsiveness in wildlife studies require standardised techniques.

Most of the techniques used to quantify vertebrate immune response require blood sampling. Such techniques include, for example, the measure of natural antibodies and complement effectiveness using a haemolysis-haemagglutination assay, the measure of the bactericidal capacity of plasma and the determination of the leucocyte profile (Matson et al., 2006; Pigeon et al., 2013). Few non-destructive methods have been developed. Among them, the phytohaemagglutinin (PHA) challenge test is the most popular because it causes no physiological stress responses in the animal other than those associated with capture and handling (Merino et al., 1999). The PHA challenge test has been used extensively in birds and reptiles (e.g., Meylan, Haussy and Voituron, 2010; Grasman et al., 2013) but more rarely in amphibians (table 1). It can be applied in natural contexts because of its short-term and localised effects and its feasibility in vivo under field conditions. This test consists of a PHA injection which produces temporary localised swelling. The use of PHA challenge test as a surrogate of T cell-mediated immunity only, as proposed in several studies (e.g., Tella et al., 2008), was questioned. Brown, Shilton and Shine (2011) showed that PHA injection initiated the rapid infiltration of neutrophils, eosinophils and macrophages at the injection site, following by an influx of lymphocytes 24 h

after injection in cane toads. A study on cytokine expression profiles in grey partridges (Vinkler et al., 2014) showed no sign of any induction of T cell proliferation at the site where PHA was injected. Recent studies have suggested that PHA-induced swelling measured, at least in part, a rapid onset, non-specific inflammatory and innate immune response (Kennedy and Nager, 2006) that may provide a clue for predicting the pro-inflammatory capacity of the individual (Vinkler et al., 2010; Vinkler and Albrecht, 2011).

This study aimed to test the possibility of using a PHA challenge test with the European tree frog, *Hyla arborea* (Hylidae), and to identify the optimal procedure for measuring the immune responsiveness in this species and, more generally in small amphibian species. Methods requiring blood sampling cannot be applied in *H. arborea*; individuals are too small (3 to 7 g) to allow blood sampling by cardiac puncture without risking the death of this protected species. To validate the PHA response, we also examined the white blood cell types that proliferate during the inflammatory response after one and two PHA injections.

## Materials and methods

### Animal collection and rearing

Individuals were obtained from a population located near Lyon, France, on the Crémieu Plateau (5°21'7"E, 45°44'20"N). During the springs of 2012 (experiments 1 and 2) and 2014 (experiment 3), male tree frog adults calling

at a pond were captured individually by hand. Males were individually housed in terrariums ( $25 \times 17 \times 15$  cm) with a water-filled basin and a tree branch placed in the housing room of our laboratory kept at temperature of  $23.1 \pm 1.5^\circ\text{C}$  (mean  $\pm$  sd). During the entire experiment, males were fed *ad libitum* with house crickets (*Acheta domesticus*) and exposed to a natural photoperiod.

#### *Treatment inocula*

PHA is a lectin derived from red kidney beans. PHA-P (L8754, Sigma-Aldrich) is a mixture of five isolectins that are tetramers composed of varying proportions of two PHA subunits, L and E (Vinkler, Bainova and Albrecht, 2010). In each experiment, PHA was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) (D5773, Sigma-Aldrich).

#### *Experiment 1: PHA dose effect*

This experiment allowed us to determine the capacity of different PHA doses for inducing an inflammatory response in *H. arborea*. Classical injection into a toe web and the standard measure of thickness (e.g., Gilbertson et al., 2003; Brown, Shilton and Shine, 2011) cannot be applied to a small species such as *H. arborea*. Hence, using a Hamilton syringe with a 26S-gauge needle ( $\pm 0.5 \mu\text{l}$  accuracy), we injected  $20 \mu\text{l}$  of PHA solution into the right leg muscle of *H. arborea*. In agreement with the ethics protocol, only nine frogs were used to test 0.25 mg, 0.5 mg or 1 mg of PHA per individual (3 individuals per dose). In order to verify the presumption of no swelling response after the PBS treatment in the tree frog,  $20 \mu\text{l}$  of PBS was injected into the left leg of the same individual. Leg swelling was measured (mean of three consecutive measures) before and 2, 10, 12, 14, 24 and 48 h after injection using a spessimeter (Mitutoyo, Absolute, 547-301, Japan) with an accuracy of 0.01 mm. The reaction to PHA was expressed as the difference between the change in thickness of the right PHA-inoculated leg and the change in thickness of the left PBS-inoculated leg. Data from experiment 1 was analysed using repeated measures ANOVA (*R* 2.12.1; R Development Core Team, 2010).

#### *Experiment 2: measure of the immune challenge response*

The goal of experiment 2 was to develop and validate the dynamic of the response after a PHA challenge test. Eighty-nine males were sampled in the field and reared in the laboratory according to the protocol described above. Twenty  $\mu\text{l}$  of PBS ( $n = 22$ ) or PHA (0.5 mg/ $20 \mu\text{l}$ ;  $n = 67$ ) was injected into the right leg of each frog (see results of experiment 1). The thickness of the leg was measured before injection and 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 h after injection. A linear mixed model (LMM) allowed us to assess the magnitude of individual changes between leg thickness before and after PHA injection. In addition, we used variance-covariance matrix with compound symmetry because we detected heteroscedasticity before and after ( $F = 0.15$ ,  $\text{df} = 23$ ,  $P < 0.001$ ). Computations were carried out with *R* 2.12.1 (R Development Core Team, 2010).

#### *Experiment 3: identification of white blood cells implicated in the PHA response*

To verify the involvement of immune cells in the swelling response, 11 males were divided into two groups: the first group (control) wherein males were injected only once (C-males,  $n = 6$ ), and the second group (experimental), wherein males were injected twice (E-males,  $n = 5$ ). According to the results of experiment 1 and 2, 1 mg of PHA diluted in  $20 \mu\text{l}$  of PBS was injected into the right leg of all males (C- and E-males). Male leg thickness was measured 16 h after PHA injection. After this first inflammatory measure, C-males were euthanized for blood sampling according to the ethics protocol (see below) and E-males were housed for 10 more days. Then, E-males received a second PHA injection under the same conditions, and leg thickness was measured 16 h after injection. These individuals were then also euthanized for blood sampling.

One drop of blood was smeared on a glass slide and air-dried. Blood smears were stained by immersion in May Grünwald-Giemsa (320-07-1 and 320-31-1, RAL Reactive, France). The identification and counts of different types of leucocytes (white blood cell types, WBCs) were obtained with a light microscope oil immersion lens ( $1000\times$ ) in a monolayer-sector of the smear. Five types of leucocytes were considered: basophils, monocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes. A differential count based on 100 leucocytes was performed for each individual (Davis, Maney and Maerz, 2008; Fokidis, Greiner and Deviche, 2008). The leucocytes number per 10 000 erythrocytes was obtained by counting the number of all erythrocytes in one microscopic visual field (no difference in erythrocytes concentration was found,  $U = 12$ ;  $P = 0.58$ ) and multiplying it by the number of microscopic visual fields that were scanned to obtain 100 leucocytes (e.g., Lobato et al., 2005; Dehnhard, Quillfeldt and Hennicke, 2011). We examined the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/L ratio). These two cell types covary with the glucocorticoid levels, and this ratio is used as a rough index of haematological stress (Gross and Siegel, 1986; Vleck et al., 2000; Davis, Maney and Maerz, 2008). All slides were examined by a single observer (O.G.) without knowledge of the treatment of the collected samples. Data from experiment 3 were analysed using the Wilcoxon matched-pairs test to compare leg swelling between the first and second injections and to compare the N/L ratio and TLC after one or two PHA injections. The correlation between the leg swelling and the number of leucocyte was tested with a Pearson test. We applied a log transformation to normalise the “WBCs” (*R* 2.12.1; R Development Core Team, 2010).

#### *Ethical note*

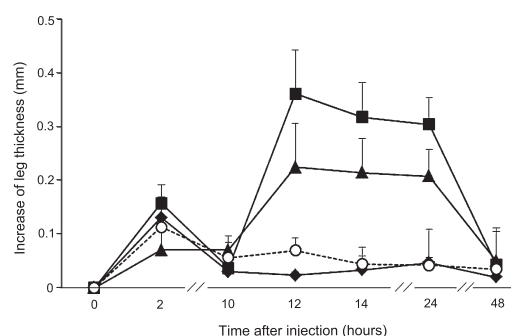
Researchers obtained the European certificate that legally allows us to design and conduct experimental research work using live animals. Our study was conducted under the approval of the ethics committee of Lyon 1 University (approval number BH2012-15). The frogs housing structure were located at the EcoAquatron of the University of Lyon and approved by the Veterinary Services (approval number

692661201). In agreement with capture authorization (prefectural approval number DDPP01-13-197), one week after manipulation, frogs were released *in natura* close to their original pond. All released frogs were in good health at the end of the experiment.

## Results

### PHA dose effect (experiment 1)

The results of the different doses of PHA injection, as shown by the mean increase in leg thickness over 48 h, are illustrated in fig. 1. The change in leg thickness of 9 frog legs injected with 20  $\mu$ l of PBS exhibited no variation in swelling during 48 h (repeated measures ANOVA,  $F_{5,40} = 1.87$ ,  $P = 0.1$ ), although a slight increase occurred 2 h after injection (fig. 1). This first peak of leg swelling also occurred with PHA, regardless of the dose used. The injection of 0.25 mg of PHA per individual induced an increase in leg thickness similar to that recorded for the PBS injection (fig. 1). In contrast, the injection of 0.5 mg of PHA per individual produced a second increase in thickness, reaching a maximum value of 0.34 mm (increase of 20% on average) 12 h after injection. The amount of swelling induced by 1 mg of PHA did not differ from the results observed with 0.5 mg of this compound and remained stable until 24 h after injection. Forty-eight hours after injection, the thickness of the leg was similar to the thickness of the

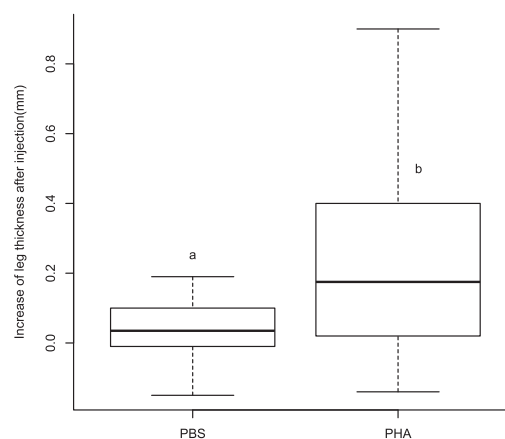


**Figure 1.** Increase (mean  $\pm$  SE) in leg thickness (mm) of *H. arborea* over 48 h following injection of 0.25 (black diamond), 0.5 (black square) and 1 (black triangle) mg of PHA or 20  $\mu$ l of PBS (white circle).

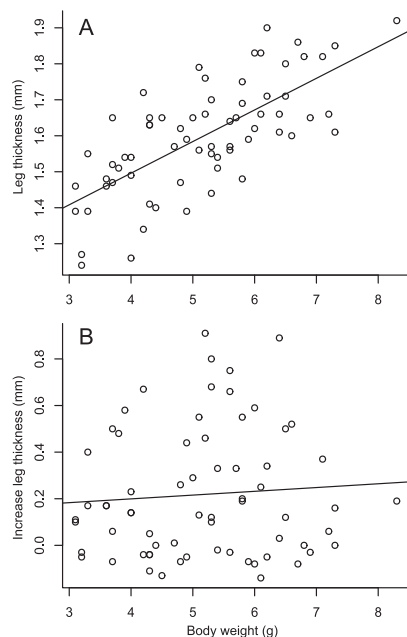
leg before PHA injection (repeated measures ANOVA,  $F_{10,30} = 10.29$ ,  $P < 0.01$ ). Because the two higher doses (0.5 and 1 mg) produced similar response times, we conducted all further trials using 0.5 mg/20  $\mu$ l.

### Immune challenge response (experiment 2)

The goal of this experiment was to verify that an injection of PHA under the experimental conditions determined in experiment 1 triggered a differential individual response in frogs. Injection of PHA induced an inflammatory response in *H. arborea* that peaked 14 h after injection ( $+0.21 \pm 0.18$  mm; fig. 2) and remained stable afterwards. The results obtained in males injected with PBS ( $n = 22$ ) and with PHA ( $n = 67$ ) showed that the change in leg thickness in response to PHA injection differed among individuals and that the thickness of the frog legs injected with PHA increased significantly compared to frog legs injected with PBS (parameter estimate = 0.21,  $t = 3.64$ ,  $df = 85$ ;  $P < 0.01$ ). We can note that although the frog mass had a significant effect on the thickness leg before injection (Pearson,  $t = 8.03$ ,  $df = 65$ ,  $P < 0.001$ , fig. 3A), the increase in leg thickness 14 hours after PHA injection was not correlated with the



**Figure 2.** Boxplot representing the increase (mean  $\pm$  SE) in leg thickness (mm) 14 h after injection of PBS or PHA ( $n = 89$ ) (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). Different letters (a and b) represent a significant difference between treatments.



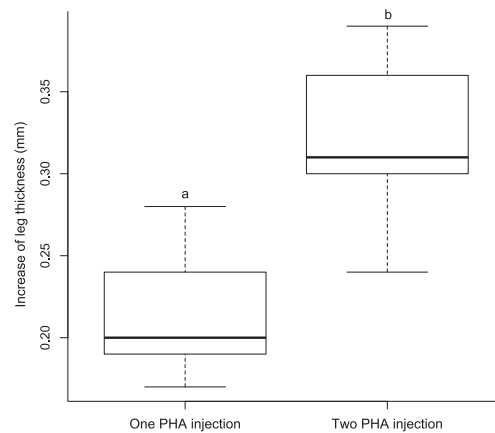
**Figure 3.** Leg thickness (mm) regressed on male mass before injection (A) and increase in leg thickness (mm) 14 hours after PHA injection regressed on male mass (B).

initial body mass (Pearson,  $t = 0.59$ ,  $df = 65$ ,  $P = 0.56$ ; fig. 3B).

#### *Cellular immune response to PHA injection (experiment 3)*

Before treatment leg thickness did not differ between groups ( $W = 13$ ;  $P = 0.78$ ). For both groups the first PHA injection induced significant swelling (all  $P < 0.05$ ), and the swelling intensity did not differ between groups ( $W = 19$ ,  $P = 0.925$ ). Ten days after the first injection, the leg thickness of E-males returned to baseline ( $W = 9.5$ ,  $P = 0.6$ ). After a second PHA injection, the swelling response was significantly more prominent in comparison with the skin swellings observed after the first injection ( $W = 2$ ,  $P = 0.03$ ; fig. 4) in E-males.

The haematological values presented in table 2 showed that using two PHA injections led to a higher leucocyte number per 10 000 erythrocytes ( $W = 2$ ,  $P = 0.04$ ; table 2) compared to using only one injection. A similar increase of lymphocytes was observed ( $W = 4$ ,  $P =$



**Figure 4.** Boxplot representing the increase in male leg thickness (mean  $\pm$  SE) swelling (mm) after one or two PHA injection (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). Different letters (a and b) represent significant a difference between treatments.

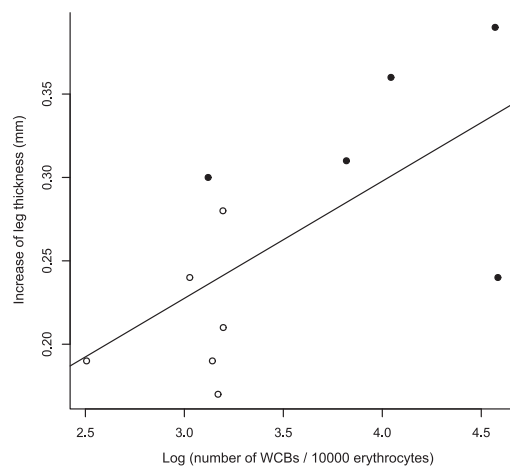
0.05). Our results also show a higher N/L ratio for C-males compared to E-males ( $W = 18$ ,  $P = 0.06$ ; table 2). We can note that the leg swelling after PHA injection was linked to the WBCs (Pearson,  $t = 2.56$ ,  $df = 9$ ,  $P < 0.05$ , fig. 5). Eosinophils are very scarce ( $<1\%$  of all WBCs) and monocytes represented 8% of all WBCs in both C- and E-males.

#### **Discussion**

Our results clearly showed that the PHA challenge test is a suitable non-destructive method that can provide a measure of immune responsiveness in *H. arborea*. Although an initial peak of swelling, representing a 15% increase in thickness, rapidly occurred after the injection of PHA or PBS, a more intense second peak (a 34% increase in leg thickness) occurred between 12 and 14 h with only a 0.5 and 1 mg/20  $\mu$ l PHA injection. This leg swelling remained stable until 24 h after injection. Because we quickly measured the first increase in leg thickness after injecting PHA or PBS, the initial swelling could have resulted from the injected fluid that remained unabsorbed. This hypothesis was consistent with the decrease in leg thick-

**Table 2.** Differential white blood cell counts expressed per 10 000 red blood cells (erythrocytes) and the ratio of neutrophils to lymphocytes (N/L) recorded in blood sampled in *H. arborea* injected once (C-males) or twice (E-males) with PHA. *P*-values less than  $\alpha = 5\%$  are indicated with an asterisk.

| Cell type<br>(/10 000 erythrocytes) | C-males           | E-males            | <i>P</i> -value |
|-------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
|                                     | Mean $\pm$ SD     | Mean $\pm$ SD      |                 |
| N/L ratio                           | 1.17 $\pm$ 0.24   | 0.72 $\pm$ 0.32    | 0.06            |
| Leucocytes                          | 63.35 $\pm$ 21.07 | 108.54 $\pm$ 36.03 | 0.04*           |
| Lymphocytes                         | 21.45 $\pm$ 4.72  | 55.44 $\pm$ 30.91  | 0.05*           |
| Neutrophils                         | 25.08 $\pm$ 12.66 | 32.75 $\pm$ 6.41   | 0.18            |



**Figure 5.** Increase in leg thickness (mm) regressed on WBCs/10000 erythrocytes expressed in logarithm after the first PHA injection (white circle) or the second PHA injection (black circle).

ness observed between 2 and 10 h suggesting slow absorption of the injected fluid. In contrast, the second swelling peak was triggered only by PHA. In this case, cytokines released from cells act as beacons for white blood cells (Kennedy and Nager, 2006; Martin et al., 2006), resulting in the rapid recruitment of white blood cells at the PHA injection site (Martin et al., 2006; Brown, Shilton and Shine, 2011) but not at the PBS injection site. Even if the temporal evolution of white blood cells in the same animal after a PHA injection was not measured in our study, the pattern of increase in *H. arborea* legs in response to PHA injection seemed similar to the pattern observed with the cane toad *Rhinella marina* and blood analyses suggest the same processes (Brown, Shilton and Shine, 2011).

One approach for clarifying the nature of the immune system responses that underlie changes in leg thickness after a PHA injection is to examine the accumulation of each blood cell type at the injection site after one and two injections using histologic methods (e.g., Martin et al., 2006). This study measured the number of circulating leucocytes after two PHA injections separated by ten days. The results showed that the WBCs observed for E-males (2 injections) is higher than for C-males (1 injection). Although we cannot exclude the possibility that the lymphocyte levels might be elevated after the first injection and simply did not have time to decrease before the second injection was applied, we can note that the number of lymphocytes involved in a variety of immunological functions, such as immunoglobulin production and modulation of immune defence (Davis, Maney and Maerz, 2008), was higher after two injections than after one injection. Although the number of neutrophils did not vary between the C- and E-males, the N/L ratio is higher for males that were injected only once; the lymphocyte proportion is thus more important after a second injection. Due to the protection regime of *H. arborea*, the initial blood parameters of animals captured in the field without PHA injection were not determined. However, it seems that the N/L ratio usually observed in amphibian species varies between 0.3–0.5 (reviewed in Davis, Maney and Maerz, 2008). Thus, we can hypothesise that, in this study, the ratios increase approximately 3-fold when the frogs are injected once and remain higher than normal after the second injection. Taken together,



these results suggest that the primary response to PHA injection is a classical non-specific innate inflammation and that the secondary response observed in E-males is adaptive (Tella et al., 2008; Vinkler, Bainova and Albrecht, 2010). Indeed, after the first contact with an antigen the cells of adaptive immunity (lymphocytes) can be activated (Akira et al., 2006), but this activation takes time (>24 h). PHA is a tetrameric structure with two subunits. Only the PHA-L subunit stimulates T-cell mitosis (Vinkler, Bainova and Albrecht, 2010). In contrast, the PHA-E subunit activates erythroagglutination but does not stimulate T-cells (Vinkler, Bainova and Albrecht, 2010). It has been shown that the PHA-E isolectin stimulates a stronger immune response than PHA-L (Vinkler, Bainova and Albrecht, 2010). In addition, the results of experiment 2 in this study, using a substantial number of individuals, clearly showed that individuals respond with different amplitudes, confirming that the PHA responses can provide a robust measure of anuran immune responsiveness. In addition, we have also shown that a second PHA injection induces a larger tissue swelling (49.7% on average) than the first one. Moreover we found a significant positive relationship between leg swelling and the total number of circulating leucocytes number. In a bird study, Martin et al. (2006) showed significant correlations between the numbers of immune cell types and the degree of wing-web swelling. Particularly, they suggest that the link between swelling only 6 h after PHA injection represents a high degree of cytokine secretion by these cell types at this time, leading to increased infiltration and subsequent degranulation of other effector cells (e.g., heterophils, macrophages and basophils) shortly thereafter (Martin et al., 2006).

Although *H. arborea* was too small for toe web injection, we successfully injected PHA into *H. arborea* legs and we reduced the number of measure by eliminating the PBS control injection, as suggested by Smits et al. (1999) in birds and Brown, Shilton and Shine (2011) in amphibians. By injecting only one leg and

measuring leg thickness only once between 14 to 24 h after injection, we reduced handling time, which causes an increase of stress hormones that affect immunosuppression (Martin et al., 2006). We also reduced the possibility of trauma during field manipulation. The results of PHA test have become a widespread measure of immune responsiveness, especially in wild birds (Martin et al., 2006). However, even if recent studies have improved our understanding of PHA assays (Salabarría et al., 2013; Vinkler et al., 2014), the immunological background of the test is highly complex and the results of the swelling should be interpreted with caution (Kennedy and Nager, 2006; Martin et al., 2006; Owen and Clayton, 2007; Vinkler, 2010). Further investigations are particularly needed to verify whether the test reflects resistance to any particular type of parasite (Owen and Clayton, 2007).

**Acknowledgements.** We thank A. Clair, G. Mialdea and A. Dumet for technical assistance in the EcoAquatron, L. Brepson and the two anonymous reviewers for helpful suggestions, and "Journal American Expert" for English correction.

## References

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801.
- Boughton, R.K., Joop, G., Armitage, S.A.O. (2011): Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. *Funct. Ecol.* **25**: 81-100.
- Brown, G., Shilton, C., Shine, R. (2011): Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Methods Ecol. Evol.* **2**: 341-348.
- Carey, C., Cohen, N., Rollins-Smith, L. (1999): Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 459-472.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. (2008): The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* **22**: 760-772.
- Dehnhard, N., Quillfeldt, P., Hennicke, J.C. (2011): Leukocyte profiles and H/L ratios in chicks of red-tailed tropicbirds reflect the ontogeny of the immune system. *J. Comp. Physiol. B* **181**: 641-648.
- Demas, G.E., Zysling, D.A., Beechler, B.R., Muehlenbein, M.P., French, S.S. (2011): Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *J. Anim. Ecol.* **80**: 710-730.

- Fokidis, H.B., Greiner, E.C., Deviche, P. (2008): Interspecific variation in avian blood parasites and hematology associated with the urban-rural gradient of a desert city. *J. Avian Biol.* **39**: 300-310.
- Gervasi, S.S., Fougopoulos, J. (2008): Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Funct. Ecol.* **22**: 100-108.
- Gilbertson, M.K., Haffner, G.D., Drouillard, K.G., Albert, A., Dixon, B. (2003): Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 101-110.
- Grasman, K. (2002): Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integr. Comp. Biol.* **42**: 34-42.
- Gross, W.B., Siegel, P.B. (1986): Effects of initial and second periods of fasting on heterophil/lymphocyte ratios and body weight. *Avian Dis.* **30**: 345-346.
- Kennedy, M., Nager, R. (2006): The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* **21**: 653-655.
- Kinney, K.S., Cohen, N. (2005): Increased splenocyte mitogenesis following sympathetic denervation in *Xenopus laevis*. *Dev. Comp. Immunol.* **29**: 287-293.
- Lobato, E., Moreno, J., Merino, S., Sanz, J.J., Arriero, E. (2005): Haematological variables are good predictors of recruitment in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Ecoscience* **12**: 27-34.
- Martin, L.B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J., Klasing, K., Wikelski, M. (2006): Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funct. Ecol.* **20**: 290-299.
- Matson, K., Cohen, A., Klasing, K., Ricklefs, R., Scheuerlein, A. (2006): No simple answers for ecological immunology: relationships among immune indices at the individual level break down at the species level in waterfowl. *Proc. R. Soc. B* **273**: 815-822.
- Merino, S., Martinez, J., Møller, A.P., Sanabria, L., De Lope, F., Pérez, J., Rodrigues-Caabeiro, F. (1999): Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Anim. Behav.* **58**: 219-222.
- Meylan, S., Haussy, C., Voituron, Y. (2010): Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **169**: 158-166.
- Owen, J.P., Clayton, D.H. (2007): Where are the parasites in the PHA response? *Trends Ecol. Evol.* **22**: 228-229.
- Pigeon, G., Bélisle, M., Garant, D., Cohen, A., Pelletier, F. (2013): Ecological immunology in a fluctuating environment: an integrative analysis of tree swallow nestling immune defense. *Ecol. Evol.* **3**: 1091-1103.
- R Core Team (2010): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Salaberria, C., Muriel, J., de Luna, M., Gil, D., Puerta, M. (2013): The PHA test as an indicator of phagocytic activity in a passerine birds. *PLoS ONE* **8** (12): e84108.
- Smits, J.E., Bortolotti, G.R., Tella, J.L. (1999): Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.* **13**: 567-572.
- Tella, J.L., Lemus, J.A., Carrete, M., Blanco, G. (2008): The PHA test reflects acquired T-cell mediated immunocompetence in birds. *PLoS ONE* **3**: e3295.
- Venesky, M., Wilcoxon, T., Rensel, M., Rollins-Smith, L., Kerby, J., Parris, M. (2012): Dietary protein restriction impairs growth, immunity, and disease resistance in southern leopard frog tadpoles. *Oecologia* **169**: 23-31.
- Vinkler, M., Albrecht, T. (2011): Handling 'immunocompetence' in ecological studies: do we operate with confused terms? *J. Avian Biol.* **42**: 490-493.
- Vinkler, M., Bainova, H., Albrecht, T. (2010): Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Funct. Ecol.* **24**: 1081-1086.
- Vinkler, M., Svobodova, J., Gabrielova, B., Bainova, H., Bryjova, A. (2014): Cytokine expression in phytohaemagglutinin-induced skin inflammation in a galliform bird. *J. Avian Biol.* **45**: 43-50.
- Vleck, C.M., Vernalino, N., Vleck, D., Bucher, T.L. (2000): Stress, corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins. *Condor* **102**: 392-400.

Submitted: December 5, 2014. Final revision received: February 26, 2015. Accepted: March 10, 2015.

Associate Editor: Caitlin Gabor.

## **Article 2 : Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity ?**

**Desprat J.L.**, Lengagne T., Dumet A., Desouhant E., Mondy N.  
*Behavioural Ecology*, 26 (2015), 1138-1146.

### **Problématique :**

Dans un contexte de sélection sexuelle, les signaux sexuels mâles doivent refléter honnêtement la qualité de l'émetteur pour que la femelle puisse retirer des bénéfices indirects de la sélection du partenaire qu'elle a effectué. Les différentes hypothèses et postulats permettant d'expliquer l'honnêteté des signaux (Zahavi, 1975, 1977 ; Hamilton et Zuk, 1982) ont été enrichis en 1992 par l'hypothèse du handicap immunitaire (ICHH) proposée par Folstad et Karter. Selon ces auteurs, il existe un compromis, régulé par la testostérone, entre le système immunitaire et la production des signaux sexuels secondaires. Cette hormone contrôlerait l'expression des signaux sexuels et entraînerait une dépression du système immunitaire. Par conséquent, seuls les individus de bonne qualité et en bonne santé seraient alors capables de supporter l'immunodéficience due à la testostérone tout en produisant des signaux attractifs pour les femelles. L'effet à double tranchant de la testostérone suggère un rôle prépondérant de cette hormone dans l'honnêteté des signaux sexuels. Majoritairement testée sur les oiseaux et en ne prenant en compte qu'une seule modalité de signal (souvent le chant), cette hypothèse pourrait être vue comme un mécanisme unificateur pour expliquer l'honnêteté du signal, quelle que soit la modalité sensorielle dans le cas des communications multimodales.

### **Objectif :**

L'originalité de l'étude présentée est de tester l'ICHH dans un contexte de communication multimodale chez *H. arborea*. En effet, les femelles de cette espèce utilisent à la fois des signaux visuels et acoustiques pour choisir leur partenaire (Richardson et al., 2010a).

### **Hypothèses :**

- H1.a : la couleur du sac vocal des mâles est testostérone-dépendante.
- H1.b : le chant des mâles est testostérone-dépendant.
- H2 : la testostérone est immunosuppressive.

### **Méthodes :**

Nous avons expérimentalement manipulé le taux de testostérone chez 96 mâles *H. arborea* par application topique d'une solution avec ou sans testostérone à une concentration de 3 mg/ml. Régulièrement durant 20 jours, les individus sont enregistrés et la couleur du sac



vocal est mesurée. À la fin de l'expérimentation, la réponse immunitaire des individus a été mesurée après une injection de phytohaemagglutinine (PHA).

#### **Résultats :**

- Les mâles supplémentés en testostérone chantent plus longtemps et plus grave que les témoins après 20 jours de traitement ;
- Les mâles supplémentés en testostérone ont un sac vocal plus foncé que les témoins après 20 jours de traitement ;
- La réponse immunitaire des mâles forts en testostérone dépend de leur masse corporelle. Les mâles supplémentés en testostérone avec une meilleure condition corporelle présentent une immuno-stimulation à la PHA.

#### **Conclusion :**

Les signaux sexuels acoustiques et colorés chez *H. arborea* sont testostérone-dépendants. En revanche, contrairement à notre hypothèse, la testostérone ne provoque pas d'immunosuppression chez cette espèce. De manière surprenante, certains mâles supplémentés en testostérone (les plus gros) ont une réponse immunitaire améliorée. Ces résultats ne nous permettent pas de valider l'hypothèse de l'ICHH chez *H. arborea* et suggèrent que d'autres mécanismes peuvent expliquer l'honnêteté des signaux sexuels.

#### Erratum :

Page 4, Figure 2 : les prélèvements salivaires au cours de la saison de reproduction sont effectués du 20 avril 2013 au 25 mai 2013.



Original Article

# Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity?

Julia L. Desprat,<sup>a</sup> Thierry Lengagne,<sup>a</sup> Adeline Dumet,<sup>a</sup> Emmanuel Desouhant,<sup>b</sup> and Nathalie Mondy<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Université de Lyon, UMR 5023 Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, F - 69622 Villeurbanne, France and <sup>b</sup>Université de Lyon, UMR 5558 Biométrie et Biologie Évolutive, Université Lyon 1, CNRS, F - 69622 Villeurbanne, France

Received 11 November 2014; revised 2 April 2015; accepted 3 April 2015; Advance Access publication 1 May 2015.

The immunocompetence handicap hypothesis (ICHH) assumes that testosterone plays a dual role in mediating both sexual signal expression and immunosuppression. Although there is good evidence of the ICHH in birds, it was primarily tested using only one sexual signal approach. By focusing on the European tree frog *Hyla arborea*, a species for which mate choice is based on both acoustic and visual signals, we test for the first time the ICHH in a multimodal communication system. The ICHH may be viewed as a universal way to explain signal honesty no matter the sensory modality used by animals. After studying the effects of testosterone on the acoustic and visual sexual signals through a daily testosterone supplementation, the effects of androgen on the immune system response were measured through a phytohaemagglutinin injection. In *H. arborea*, we demonstrate that both the acoustic and visual sexual signals were testosterone dependent. However, the phytohaemagglutinin injection did not provoke immunosuppression for testosterone-supplemented males. Surprisingly, the testosterone-supplemented males with a high body mass presented an immunoenhancement. Therefore, it seems that ICHH is not an integrating mechanism that is able to explain signal honesty in the multimodal signaling system used by *H. arborea* in mate choice. On the contrary, our results support the idea that multiple mechanisms (e.g., cost-added and index signals) operating simultaneously may explain signal honesty of both acoustic and visual signals.

**Key words:** acoustic signal, communication, *Hyla arborea*, phytohaemagglutinin, sexual selection, visual signal.

## INTRODUCTION

In many species, females invest more in reproduction than males and are the choosy sex. Usually, choice is not random and females expect to gain benefits from their choices. In species in which males contribute nothing beyond their sperm, females are expected to choose males based on “indirect benefits” (Andersson 1994). Because males differ in their quality, mate preference must confer genetic benefits to the offspring (the “good genes hypothesis” and/or “compatible gene hypothesis,” from Neff and Pitcher 2005). Whereas the assessment of male quality as a prospective mate is crucial, a direct assessment is often impossible. Therefore, females rely on males to honestly advertise their quality as potential mates

through honest sexual signals. Signal honesty can be achieved through several main types of signals, such as cost-added signals and index signals (Maynard Smith and Harper 1995).

Because the immune system competes for resources with sexually selected ornaments, the mechanism proposed by the immunocompetence handicap hypothesis (ICHH) is another way to consider signal honesty in the mate choice context (Folstad and Karter 1992). It suggests that testosterone serves a dual role in mediating both sexual signal expression and immunosuppression. The immunosuppressive effect of testosterone can be explained by the indirect action promoting the allocation of energy to reproduction—behavior and metabolism—rather than maintenance of the immune system (Norris and Evans 2000). As a consequence, high testosterone levels result not only in full sexual signal expression but also in a concomitant reduction of immunocompetence. Therefore, only high-quality males can afford to both fully express sexual traits and be able to resist or tolerate parasite/pathogen attack.

Address correspondence to J.L. Desprat, who is now at Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR 5023, Laboratoire d'Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Equipe Ecophysiologie, Comportement, Conservation, Bâtiment Darwin C, 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622 VILLEURBANNE Cedex, France. E-mail: julia.desprat@gmail.com.

One of the main assumptions of the ICHH is that elevated testosterone plays an important role in the expression of sexual signals (Folstad and Karter 1992). Such a hypothesis is supported by studies that show the regulation of sexual songs by testosterone (e.g., in birds, such as *Junco hyemalis carolinensis*, Enstrom et al. 1997; or mammals, such as *Scotinomys teguina* [singing mouse], Pasch et al. 2011). Similarly, testosterone influences the expression of colored sexual signals (e.g., in birds, such as *Carpodacus mexicanus*, Stoeckl and Hill 2001; or reptiles, such as *Sceloporus jarrovi*, Cox et al. 2008). Although there is good evidence of a deleterious effect of elevated testosterone on humoral immunity (Peters 2000), as well as on cell-mediated immunity (Deviche and Cortez 2005), other studies have not found an effect on either (Buchanan et al. 2003; Roberts, Buchanan, Hasselquist, et al. 2007).

Most of the studies of ICHH focus on a single male sexual signal and, particularly, on males with a colored ornamented signal (Evans et al. 2000; Faivre et al. 2003). However, males often produce complex signals with different sensory modalities. For example, male wood-warblers are both brightly ornamented and perform an elaborate song (Taff et al. 2012). The association of several signals may increase the reliability of the information (Candolin 2003), whereas the use of 2 modalities increases the discrimination accuracy (Gomez et al. 2011). Although the communication process appears to be largely multimodal, the ICHH has never been investigated in a multimodal communication system. Nevertheless, the ICHH could be viewed as a universal way to explain signal honesty no matter the sensory modality used by animals.

In the present study, we experimentally investigated the ICHH as a way to understand signal honesty in both the acoustic and visual communications of the European tree frog (*Hyla arborea*). *H. arborea* is a lekking species and previous experiments clearly established that females choose their mate based on acoustic signals and vocal sac coloration. Indeed, females showed a significant preference for higher call rates and calls of short duration, as well as for higher call amplitudes (Richardson et al. 2010). They also favored lower peak frequencies. As the dominant frequency was negatively correlated with body weight, such a preference should lead to their selecting larger males (Richardson et al. 2010). Also, given equally attractive calls, females prefer males with a colorful and intense (darker and more chromatic) vocal sac over a pale (lighter and less chromatic) vocal sac (Gomez et al. 2009, 2010). Whereas acoustic signals are well studied and represent a short-term indicator of male quality based on their energetic state (Voituron et al. 2012; Brepson et al. 2013), few studies have investigated the role of visual signals as a male quality indicator in the tree frog. Concerning the ICHH, the demonstration of the relationship between the immune function and sexual signal production require experiments in which testosterone levels of *H. arborea* are manipulated. Here, we experimentally increased the male's testosterone levels and we predicted that testosterone-supplemented males would have both more colored vocal sac and more attractive calls at the end of the experiment. Simultaneously, we predicted that the immune response of testosterone-supplemented males would be less intense than control ones.

## METHODS

### Male capture and housing conditions

Ninety-six *H. arborea* calling males (i.e., sexually mature males) were collected during nightly choruses in mid-April 2013

from a population located near Lyon, France (45°56'33.34"N, 4°55'1.96"E).

After their capture, the individuals were housed in the laboratory in individual terrariums (25 × 17 × 15 cm) with a water-filled basin and a tree branch. In addition to the natural light of the room, the terrariums were placed under a neon light (Exo Terra-Neon reptile Glo 5.0; 40 W; 30% UVA; 5% UVB) with timers set to guarantee 12 h of light minimum per days. Every night, the males were stimulated using a recording of the chorus playback of their population. In this way, we provided an identical stimulation over the captivity for all males. Because in natura the males *H. arborea* switch between calling and hunting periods, then during the entire experiment, the males were fed with 2 domestic crickets (*Acheta domesticus*) every 2 days.

### Experimental design

The day before the beginning of the experiment (D0), each male was weighed and its call and vocal sac coloration were recorded. Simultaneously, a saliva sample was taken to estimate the testosterone levels. Then, males were randomly assigned to 2 groups of 48 individuals each: T-males (testosterone-supplemented males) and C-males (control males). The T-males' testosterone circulating levels were manipulated using a noninvasive method. Testosterone was delivered transdermally to each frog. Testosterone (Testosterone purum > 99.0%, number 86500, FLUKA Analytical, Sigma-Aldrich) was diluted in commercial-grade sesame oil to obtain a 3.10<sup>9</sup> pg/mL hormone solution. About 4.5 μL of hormone solution was applied with a micropipette on the back of T-males each day during the duration of the experiment, whereas C-males received an identical amount of sesame oil. In order to avoid the risk that testosterone could be flushed in the basin water, frogs were carefully put away from it for few minutes that insures a good transdermal infiltration. Ten (D10) and 20 days (D20) after the beginning of the experiment, the body mass, testosterone levels, and characteristics of the call and vocal sac coloration of each male were measured and recorded. At D20, a measure of immune reaction was performed by a phytohaemagglutinin injection on 30 randomly chosen males (14 T-males and 16 C-males). Because of an ethical protocol, we were not authorized to inject phytohaemagglutinin into all males.

In addition, the natural variation of testosterone levels during the entire breeding season (from 20 April 2013 to 22 May 2013) was recorded by collecting the saliva of randomly sampled males in the pond (*N* = 40). The breeding season of *H. arborea* is well known in our studied sites since first investigations in 2008. Frog activity was checked every night from the beginning of April to the end of May to be sure to take into account all the breeding season.

### Recording and call analysis

We measured individual male call characteristics by recording their acoustic response to a chorus playback in a semianechoic chamber (40 × 40 × 40 cm) using a Sony ECM-T6 directional microphone connected to digital recorders (Roland R-44 or Fostex FR-2LE; Fe 22.05 kHz) during a 4-h period beginning at 8.00 PM on the nights D0, D10, and D20. In *H. arborea*, the mating calls are produced in series named bouts that usually contain an average of 26 calls (Richardson et al. 2010). Using Avisoft SASLab©, we extracted the main acoustic parameters: the average bout duration (in ms) and the within-bout call rate (WCR, in calls/s), which corresponds to the rhythm of call emission during each bout. In addition, the first

harmonic, which is usually the frequency with the highest energetic content of the call (named dominant frequency), was measured using a Fast Fourier Transform analysis (FFT windows size: 1024 pts; accuracy: 21.5 Hz).

### Coloration measurements

The vocal sac coloration of males was measured using a JAZ-Ocean optics spectrophotometer (AvaSpec-3648-SPU2, Avantes) with a deuterium–tungsten halogen lamp light source (AvaLight DHS, Avantes) emitting in the range 200–1500 nm and a coaxial optic fiber (FCR-7UV200-2-45-ME, Avantes) reflective to white reference and dark noise. The obtained average of the reflectance spectrum was analyzed using the software AVICOL®, version 5 (Gomez 2006) to extract brightness (the mean reflectance within the range 350–700 nm) and the chroma, also named color saturation (the difference between the minimal and maximal reflectance divided by the mean reflectance within the range 350–700 nm) used to characterize coloration (Gomez et al. 2009). A more intense coloration is darker and more chromatic.

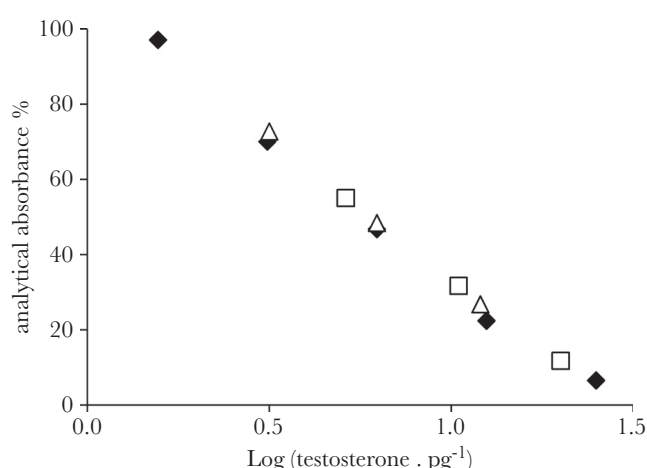
### Hormone analysis

We investigated the testosterone levels in saliva, which is a noninvasive method used for wild species steroid detection that includes amphibians (Pearson et al. 2008; Janin et al. 2012). A cotton ball was directly introduced into a frog's mouth for 20 s and put in microtube equipped with a filter to retain the cotton fiber during centrifugation. Cotton balls were weighted before and after sampling saliva, to deduct the amount of saliva. Then saliva was extracted from the cotton ball with the addition of 120 µL of a phosphate buffer (1 M phosphate solution containing 1% bovine serum albumin, 4 M sodium chloride, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.1% sodium azide) and centrifugation.

Testosterone analysis was performed in duplicate with a colorimetric 96-well testosterone Enzyme-Immuno Assay (EIA) kit (number 582701, Cayman Chemical). EIA method is based on the competition between testosterone and a testosterone–acetylcholinesterase conjugate for a limited number of testosterone polyclonal antiserum binding sites. The color reaction was developed using Ellman's reagent containing acetylthiocholine and 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). The concentration of testosterone in saliva samples was calculated using a standard curve run in duplicate on each plate. The intensity of the color, evaluated using a spectrophotometer (Absorbance Microplate Reader ELx808, Biotek) at 405 nm wavelength, is proportional to the amount of testosterone–acetylcholinesterase conjugate bound to the well, which is inversely proportional to the amount of free testosterone present in the sample. The EIA used to measure testosterone in the saliva was validated for use with *H. arborea* saliva by demonstrating parallelism between serial dilutions of 2 saliva samples and the standard curve obtained with a calibrated solution of testosterone (Figure 1). The inter-assay variation and intra-assay variation was inferior to 5%. The assay detection limit was 1.5 pg/mL. In our experiment, there was no value under this detection limit guaranteeing analyses were done with enough accuracy.

### Immunity test

The phytohaemagglutinin challenge test to assess immunocompetence of European tree frog *H. arborea* was finalized by Josseland et al. (2015). Immune response was measured after an injection of 20 µL of phosphate buffer saline (EC number 231.791.2,



**Figure 1**

Analytical absorbance % of a standard curve of testosterone (black diamond) and dilutions from 2 saliva samples of *Hyla arborea* (sample 1: white square and sample 2: white triangle) after a logarithmic transformation of the testosterone quantity (in pg). Testosterone concentrations across unknown dilutions from 2 preliminary samples were parallel to the standard curve and between them. This result indicates that antibodies bound the hormone in the saliva sample at a similar rate than those in the standard.

Sigma-Aldrich) with 0.5 mg of *Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin (PHA-P, L8754, Sigma-Aldrich) per animal in the right leg of 30 frogs (14 T-males and 16 C-males). Swelling was measured before and 18 h after injection with a spessimeter (ID-C112, Mitutoyo) with an accuracy of 0.01 mm.

### Statistics

We used a generalized estimating equation (GEE) statistical method to analyze the effects of testosterone (2 modalities: T-males and C-males), body mass, and the day (D0, D10, and D20) on the different sexual parameters (chroma, brightness and WCR, dominant frequency, and the average bout duration). The GEE method accounts in generalized linear models for the correlation between observations (Liang and Zeger 1986). In our models, the identity of the individuals was defined as a random effect to account for several measures (3 dates) that were performed on each male. An autoregressive of first order working correlation structure was used (other working correlation structures yielded similar conclusions). A Gamma distribution of errors (inverse link function) was used except for frequencies that were analyzed by means of a Poisson distribution (log link function). Gamma is a continuous probability distribution that is frequently used to model positive variables because it has a positive value, and its 2 parameters (shape and scale) allow it to fit with large data distributions (McCullagh and Nelder 1989). The Wald statistic, based on the asymptotic normality of estimators, was used for estimating levels of significance.

In the field, males do not sing every night during the breeding season, they alternate singing nights with hunting nights (personal observation). In this context, we had difficulties recording the males on each recording date. Only 17 males were successfully recorded at D0, D10, and D20 (10 C-males and 7 T-males). These numbers drastically reduce the statistical power of our analysis. To avoid this pitfall, we analyzed 60 individuals (27 C-males and 33 T-males) who sang and were successfully recorded at least twice on the 3 recording days.

The effect of testosterone (i.e., testosterone-supplemented vs. control) on the leg swelling response after PHA injection of the

males was explored using linear models. The body mass, a morphological indicator, was added as another explanatory variable in the models after checking that immune response was not condition dependent (Pearson test between the leg swelling and the body mass;  $t = 1.24$ ,  $df = 28$ ,  $P = 0.22$ ,  $N = 30$ ). For the linear models, residual normality, independence, and variance homogeneity were checked. For all of the statistical models, all the main effects and the interaction terms for each data set were fitted. The comparison of testosterone levels between groups was performed using a Wilcoxon–Mann–Whitney test because of the non-normality of the data distribution. For all analyses, we followed a backwards procedure to remove the variables sequentially, thus allowing us to identify the most parsimonious model. Data were analyzed using the statistical software package R (R Development Core Team 2013). The R package “geepack” and the function `geeglm` were used for the GEE analyses.

RESULTS

Testosterone levels *in natura*

At the beginning of the breeding season, when males arrived at the pond (approximately 20 April 2013), the mean testosterone levels measured in their saliva was  $9.3 \pm 3.5$  pg (mean  $\pm$  SEM) of testosterone/mg saliva (Figure 2). During the 2 following weeks, testosterone levels in the saliva increased until a peak was observed at the middle of the breeding season ( $66.0 \pm 18.0$  pg of testosterone/mg saliva on 3 May 2013). Then, the mean testosterone

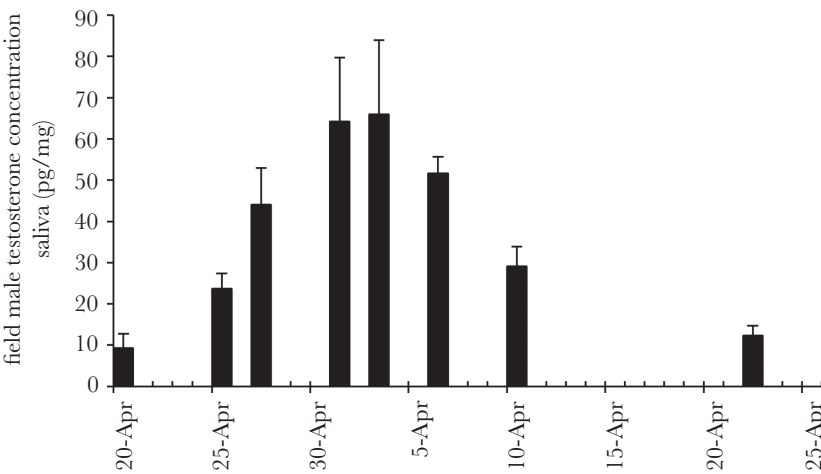
levels decreased to  $12.3 \pm 2.4$  pg of testosterone/mg saliva on 22 May 2013.

Evolution of testosterone during the experiment

At the beginning of our experiment, the mean testosterone levels in *H. arborea* saliva for both the T-males and C-males were similar ( $6.8 \pm 0.5$  and  $5.4 \pm 0.5$  pg of testosterone/mg saliva, respectively; Mann–Whitney test;  $U = 972.5$ ,  $P = 0.14$ ,  $N = 96$ ). After 10 days of the topical application of testosterone, the mean testosterone levels of the T-males was significantly higher than that recorded for the C-males ( $10.3 \pm 0.8$  and  $5.9 \pm 0.7$  pg of testosterone/mg saliva, respectively; Mann–Whitney test;  $U = 497.5$ ,  $P < 0.01$ ,  $N = 96$ ). After 20 days, the testosterone levels of the T-males were 8 times higher on average than the testosterone levels of the C-males ( $26.0 \pm 2.6$  and  $1.9 \pm 0.2$  pg of testosterone/mg saliva, respectively; Mann–Whitney test;  $U = 182$ ,  $P < 0.01$ ,  $N = 96$ ).

Testosterone effect on acoustic sexual signals

We observed a significant difference for all call parameters between the beginning and end of the experiment (day effect; Table 1, Figure 3A–C). However, the application of testosterone also induced a significant modification of 2 main acoustic parameters of the *H. arborea* call: the dominant frequency and the average bout duration (Table 1). Although the bout duration decreased during the experiment for both groups (day effect, Table 1, Figure 3C), the T-males sang longer than the C-males after 20 daily testosterone applications (treatment effect: T-males, D20,  $N = 33$ ,  $3.15 \pm 1.14$



**Figure 2** Evolution of male mean testosterone levels in the saliva (pg/mg) of *Hyla arborea* sampled at the pond during the 2013 breeding season ( $N = 40$ ). Error bars indicate SEM values.

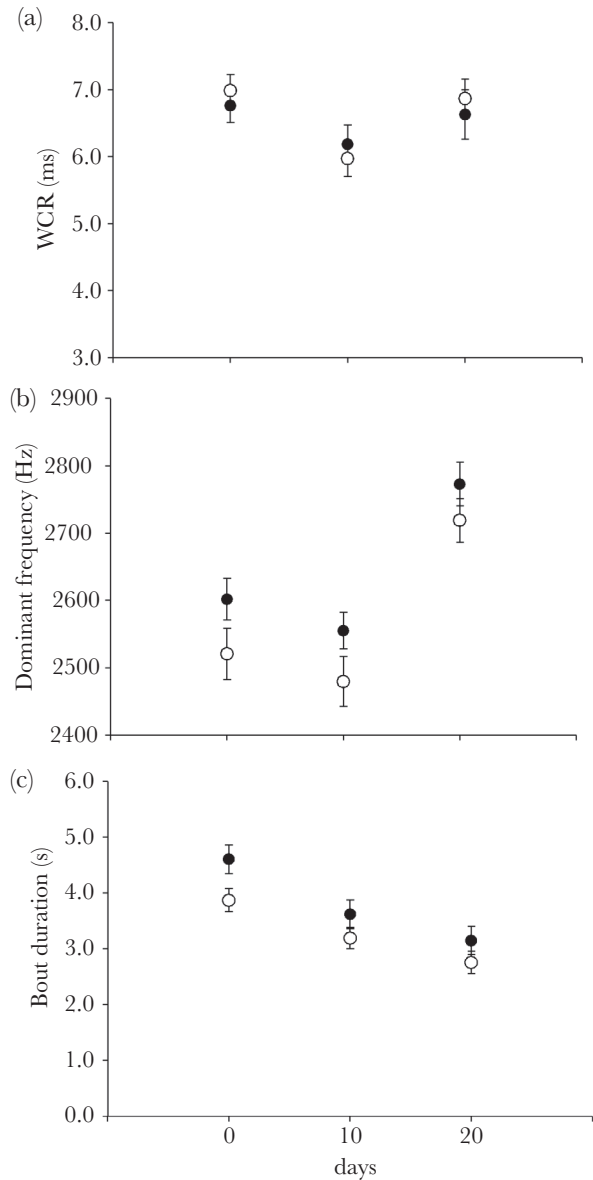
**Table 1** Results from the GEE analyses of acoustic parameters (WCR, dominant frequency, and bout duration) in *Hyla arborea*

| Variable                     | df | WCR            |                  | Dominant frequency |                  | Bout duration  |                  |
|------------------------------|----|----------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|------------------|
|                              |    | Wald statistic | P value          | Wald statistic     | P value          | Wald statistic | P value          |
| Body mass                    | 1  | 0.15           | 0.69             | 58.30              | <b>&lt;0.001</b> | 6.60           | <b>0.01</b>      |
| Day                          | 2  | 13.86          | <b>&lt;0.001</b> | 26.30              | <b>&lt;0.001</b> | 35.40          | <b>&lt;0.001</b> |
| Treatment                    | 1  | 0.38           | 0.54             | 4.90               | <b>0.03</b>      | 5.50           | <b>0.02</b>      |
| Body mass $\times$ Treatment | 1  | 0.81           | 0.37             | 0.80               | 0.36             | 0.50           | 0.49             |
| Day $\times$ Treatment       | 2  | 2.22           | 0.33             | 1.80               | 0.42             | 0.40           | 0.82             |

The independent variables tested are: body mass, day, and treatment (2 modalities: C-males and T-males). The interactions with treatment and body mass or day are presented.  $N = 60$ .  $P$  values lower than 0.05 are indicated in bold. df, degrees of freedom.



s; C-males, D20,  $N = 27$ ,  $2.76 \pm 0.82$  s). Likewise, although the dominant frequency increased during the experiment for both groups (day effect, Table 1, Figure 3B), its increase was less for T-males (approximately +170 Hz) than for C-males (approximately +200 Hz) (treatment effect). Body mass, the day, and testosterone treatment all have an effect on call parameters independent of their interactions (Table 1). In agreement with previous studies (Richardson et al. 2010), frog body mass played an important role in the call's dominant frequency and bout duration; the heaviest males had a more attractive call than the smallest one.



**Figure 3** Means of WCR (a), dominant frequency (b), and bout duration (c) of testosterone-supplemented males (T-males, black circle,  $N = 27$ ) or control males (C-males, white circle,  $N = 33$ ) who sang and were successfully recorded at least twice on the 3 recording days during the entire experiment. Error bars indicate SEM values. Output of GEE models (see Table 1), taking account the male body mass, presents a significant effect of testosterone on the dominant frequency and the bout duration vocal parameters.

Testosterone effect on vocal sac coloration

GEE models indicate that the application of testosterone had a significant effect on the brightness but not on the chroma of the vocal sac (Table 2, Figure 4A,B). There was no significant difference between the brightness of C-males and T-males at D0 ( $W = 1387$ ,  $P = 0.08$ ,  $N = 96$ ), and changes in brightness over time were linked to treatment (treatment effect; Figure 4A). Body mass had a significant effect on brightness the same way it affected the acoustic parameters (body mass effect). The heavier C-males were, the more their brightness decreased; whereas the brightness of T-males did not depend on their body mass (Body mass  $\times$  Treatment). A variation of vocal sac coloration between the initial capture date and the end of the experiment was also measured (day effect). In captivity, the vocal sac became brighter and less chromatic.

Testosterone effect on immune response

Contrary to our prediction, increasing testosterone levels in *H. arborea* did not trigger a decrease in male immunity even though the treatment and body mass interacted significantly in response to the PHA injection (Figure 5). T-males with less body mass and all C-males reacted to PHA in a similar manner. In contrast, the strength of the swelling response increased significantly for those T-males with a high body mass (linear mixed model, Body mass  $\times$  Treatment,  $N = 30$ ,  $df = 1$ , 26;  $F = 4.07$ ,  $P = 0.05$ ). Qualitatively, the model's interpretation does not change if the outlier individual (Chi-squared = 7.34,  $P = 0.007$ , increased leg thickness: 0.49) is removed from the data set (linear mixed model, Body mass  $\times$  Treatment,  $N = 29$ ,  $df = 1$ , 25;  $F = 5.05$ ,  $P = 0.03$ ).

We did not find that sexual signal parameters were correlated with immune response (all  $P > 0.05$ ).

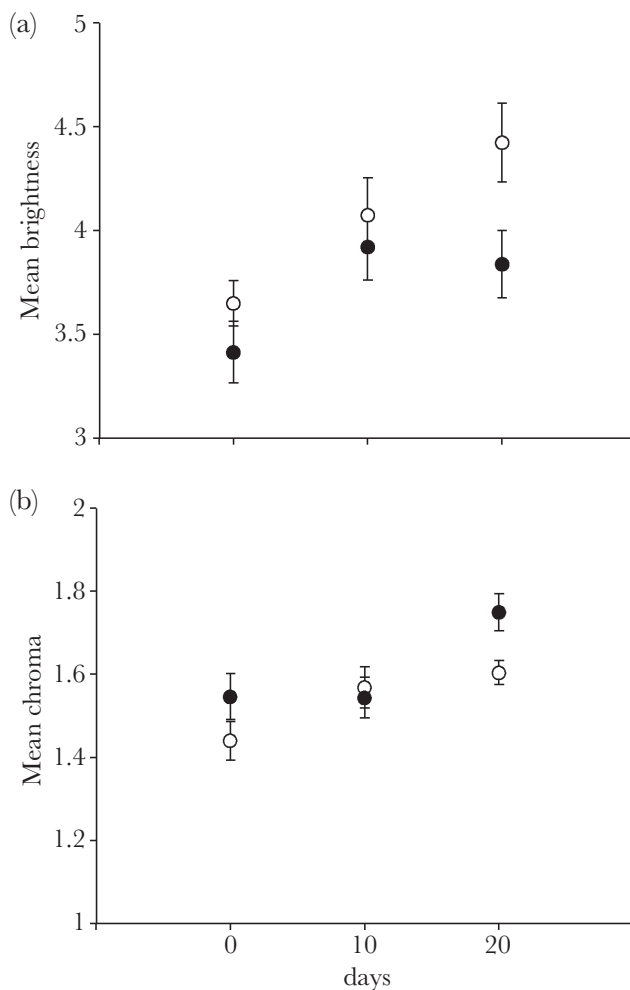
DISCUSSION

Our study, on *H. arborea*, a lekking species that uses both visual and acoustic signals in mate selection, tested the 2 main assumptions of the ICHH in a multimodal communication context. As predicted by the ICHH, several components of acoustic and visual sexual signals are testosterone dependent in *H. arborea*. Nevertheless, our results did not reveal an immunosuppression effect of testosterone and, thus, we did not validate the ICHH as a proximate mechanism explaining signal honesty in *H. arborea*.

**Table 2** Results from GEE analyses of visual parameters (brightness and chroma) in *Hyla arborea*

| Variable                     | df | Brightness     |                 | Chroma         |             |
|------------------------------|----|----------------|-----------------|----------------|-------------|
|                              |    | Wald statistic | P value         | Wald statistic | P value     |
| Body mass                    | 1  | 9.28           | <b>&lt;0.01</b> | 0.01           | 0.97        |
| Day                          | 2  | 8.57           | <b>0.01</b>     | 6.96           | <b>0.03</b> |
| Treatment                    | 1  | 7.13           | <b>&lt;0.01</b> | 0.02           | 0.90        |
| Body mass $\times$ Treatment | 1  | 4.48           | <b>0.03</b>     | 0.01           | 0.91        |
| Day $\times$ Treatment       | 2  | 1.03           | 0.60            | 3.02           | 0.22        |

The independent variables tested are: body mass, day, and treatment (2 modalities: C-males and T-males). The interactions with treatment and body mass or day are presented.  $N = 96$ .  $P$  values lower than 0.05 are indicated in bold. df, degrees of freedom.



**Figure 4**

Means of male vocal sac brightness (a) and chroma (b) of testosterone-supplemented males (T-males, black circle) or control males (C-males, white circle) during the entire experiment for the 3 recording days.  $N = 96$  for each recording day. Error bars indicate SEM values. Output of GEE models (see Table 2), taking account the male body mass, presents a significant effect of testosterone on the brightness color parameter.

### Testosterone-dependent sexual signals

Gonadal testosterone secretion typically occurs at the beginning of the breeding season and seasonal changes in hormone levels correlate with seasonal changes in calling behavior (e.g., Maddison et al. 2012; and reviewed in anurans by Arch and Narins 2009) or in male coloration (e.g., Lindsay et al. 2009). To be realistic, we checked that testosterone levels of supplemented males remained within the limits that are observed in the wild.

Several studies have shown an improvement of male coloration within the breeding season (Salvador et al. 1996; Stoehr and Hill 2001); surprisingly, such an approach is scarce concerning acoustic signals (Enstrom et al. 1997). In our experimental conditions, although we observed a time effect that was likely a result of captivity conditions, we observed a modification of both the dominant frequency and bout duration for T-males (those who experienced an increase in testosterone levels) with regards to the call characteristics produced at the beginning of the experiment by the same males. Several acoustic parameters, such as dominant frequency, are often linked to the emitter morphology (review of 136 frog

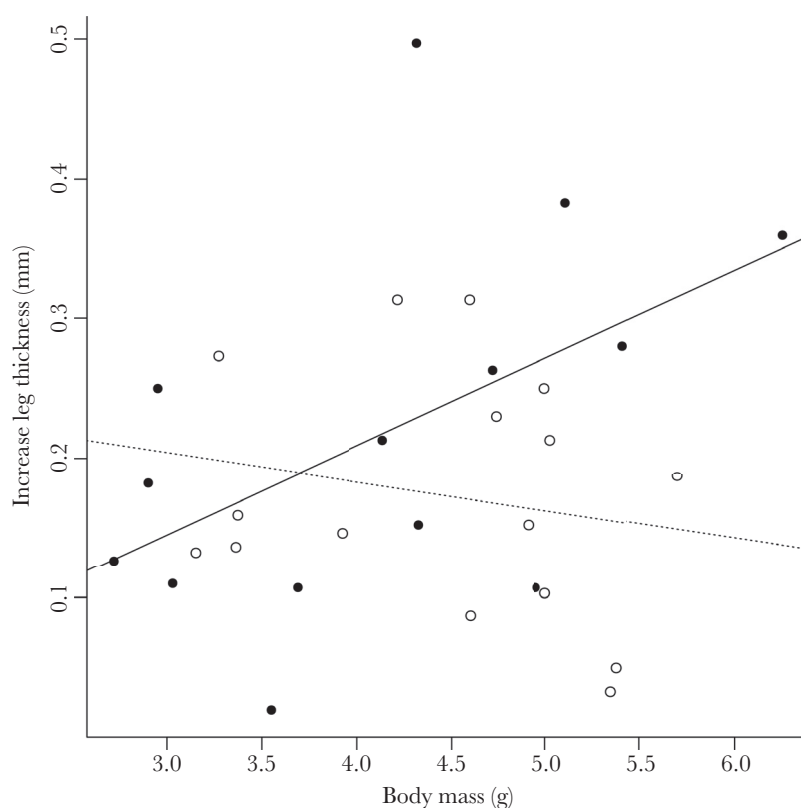
species by Gingras et al. 2013). This is also the case in *H. arborea* with larger males calling at lower frequencies (Richardson et al. 2010; Gomez et al. 2011). However, because frog body mass did not increase during the entire experiment, we may dismiss this hypothesis to explain our results. The physiological action of testosterone on trunk muscles could be a second explanation of our results (Leary 2009).

To our knowledge, the present study is the first to emphasize a testosterone effect on the vocal sac coloration parameters in anurans. According to another study conducted on blue tits *Cyanistes caeruleus* (Remy et al. 2010), we failed to show that coloration was modified through a chroma effect. Our results clearly showed that testosterone treatment modified the vocal sac brightness. Indeed, T-males were more colorful than C-males and exhibited a darker vocal sac at the end of the experiment relative to their color at the beginning of the experiment. In *H. arborea*, the vocal sac coloration primarily depends on carotenoid pigments (Richardson et al. 2010) that are obtained exclusively in their diet. In our experiment, males did not have access to an external source of carotenoids because domestic crickets are free of carotenoids. During the first 10 days of the experiment, the brightness of both the T-males and C-males vocal sacs increased. Then, the brightness of the T-males vocal sac remained the same, whereas the brightness of the C-males vocal sac continued to increase. In a pioneer study, Blas et al. (2006) showed that carotenoid levels in the liver and plasma of testosterone-supplemented birds were higher than those of control birds, and the integument coloration was strongly associated with circulating carotenoids in the plasma. They concluded that testosterone increases the bioavailability of carotenoids, which impacts coloration. In the absence of an input of stream carotenoids, our results suggested 2 nonexclusive mechanisms to explain the role of testosterone in the bioavailability of carotenoids and the mechanism underlying the stabilization of brightness in T-males: 1) testosterone could prevent the degradation of vocal sac carotenoids and 2) testosterone could promote the redistribution of carotenoids from the liver to the vocal sac through plasma. Further investigations are necessary to test these hypotheses.

Hence, testosterone appears to affect the quality of visual and acoustic signals emitted by males. In both cases, signal modifications from the high testosterone levels observed in tree frogs promote more attractive traits in males (Gomez et al. 2009; Richardson et al. 2010).

### Immune response and testosterone

Our results did not support one main assumption of the ICHH, which suggests that elevated testosterone has a deleterious effect on the immune system (Folstad and Karter 1992). In our experiment, the immune responsiveness of *H. arborea* was measured by using the PHA challenge test. Even if the immunological background of the test is highly complex, recent studies have improved our understanding and have suggested that PHA-induced swelling measured, at least in part, a rapid onset, nonspecific inflammatory and innate immune response (Kennedy and Nager 2006; Josserand et al. 2015) that may provide a clue for predicting the pro-inflammatory capacity of the individual (Vinkler et al. 2010; Vinkler and Albrecht 2011). Nevertheless, to quantify vertebrate immune response, several authors used PHA test combined with another test such as the measure of natural antibodies, bacteria killing assay, and white cell counts (e.g., Buchanan et al. 2003; Pigeon et al. 2013). Multiple immune measure methods could reveal different evidence for ICHH as shown by Buchanan et al. (2003) in *Passer domesticus*. In



**Figure 5**

Effect of the interaction between treatment and body mass on leg thickness (in mm) of *Hyla arborea* after PHA injection ( $N = 30$ ). The increase of leg thickness is a measure of immune response. Predictions of the linear model for the significant interaction between the 2 explanatory variables (body mass and testosterone treatment) are represented (full and dotted lines for T-males (black circle) and C-males (white circle), respectively).

our case, other measurements than PHA measure would require blood samples that are technically very complex to obtain because of the high risk of death for *H. arborea*. It was also impossible to use a functional response such as survival like in insects (González-Tokman et al. 2012) because manipulating infection and measuring survival is not allowed on wild protected amphibian species (1976 French laws on biodiversity protection).

Nevertheless, the interaction between treatment and body mass revealed that the immune response was not the same for T-males and C-males: a positive trend was found only for T-males. Larger T-male (greater than 4.5 g) had a better immune response than small T-male. Similar effects have been found in birds (Buchanan et al. 2003; Roberts et al. 2009) without any clear explanation. The interaction of testosterone treatment and body mass effects could be an indirect consequence of energy reallocation from the immune system to other metabolic demands (e.g., Owen-Ashley et al. 2004; Alonso-Alvarez et al. 2007). Energy reallocation may be caused by leptin, a hormone primarily produced in lipogenic tissues, which regulates the amount of fat stored in the body (Brann et al. 2002). Only the individuals able to maintain large lipid reserves (with high leptin levels), whereas sustaining high testosterone levels, might be able to develop sexual displays without any impairment of their immune defenses (Alonso-Alvarez et al. 2007). This hypothesis does not entirely explain the immune-enhancement observed in those T-males with high body mass in *H. arborea*, but this should be considered.

Another possibility is the action of corticosterone, which is often correlated with testosterone levels (e.g., Evans et al. 2000; Roberts

et al. 2009) and is known to be an immunosuppressive (in review, Buchanan 2000; in iguana *Amblyrhynchus cristatus*, Berger et al. 2005). Evans et al. (2000) suggest that testosterone has a dual effect: it leads to immunosuppression through a mechanism involving corticosterone (see Buchanan et al. 2003; Roberts, Buchanan, Bennett, et al. 2007; Roberts et al. 2009); however, conversely, it leads to increased immunocompetence, likely via dominance behavior, influencing access to nutritional resources. Because in our experiment, we did not manipulate or observe corticosterone levels of *H. arborea* males, we cannot verify that it was not that hormone which played a role in the immunoenhancement observed in T-males.

### Signal honesty in *H. arborea*

Whereas the expressions of both acoustic and visual signals are often linked to androgen, Blas et al. (2006) emphasize the lack of studies integrating both signaling systems in the same vision of signal honesty. However, the strength of sexual selection is strong in lekking species with a great variance in male breeding success. In this situation, mate selection by females is not a random phenomenon, although male density could decrease their ability to discriminate male quality (Richardson and Lengagne 2010). Females rely on signal characteristics emitted by males to infer their potential quality as a mate and the fitness benefits that such a choice can confer.

Several mechanisms dealing with signal honesty have been suggested in previous studies conducted on acoustic and visual signals in *H. arborea*. First, as suggested by the cost-added signals definition (Maynard Smith and Harper 1995), many signal



components used by females in their mate choice are costly to produce and to maintain. Such costs associated with signal productions may prevent cheating (Zahavi 1977), although some studies show that signal honesty can be maintained even with null or negative realized costs (Getty 1998; Szamado 1999). This is the case with the call rate, WCR, call amplitude or a preference for leader males (Richardson et al. 2008, 2010). Moreover, in some cases, this energetic cost differs for large and small males, a mechanism that could prevent cheating among low quality males (Voituron et al. 2012). Concerning visual sexual signals, as suggested by Gomez et al. (2009), a carotenoid-based coloration may be costly to maintain because these pigments are also involved in immune function (Faivre et al. 2003). Finally, according to the definition of index signal (Maynard Smith and Harper 1995), the low frequency calls preferred by females allow them to select large males. Indeed, such spectral call characteristics seem to be mechanically linked to the individual's body mass both at the inter- and intra-specific level, and the frequency can thus be viewed as an honest indicator of a male's body mass (Hoskin et al. 2009; Richardson et al. 2010).

The originality of our study relies on the measurements of multimodal signals in the context of ICHH. This study calls also for future research that will integrate both multimodal signals and several proxies of the immune response to test ICHH. This integrative approach is now necessary to improve our understanding of the link between immunocompetence and sexual selection.

## Ethical note

Researchers obtained the European certificate that legally allows us to design and conduct experimental research work using live animals and all work was performed with the approval of the ethic's committee at Lyon 1 University (BH2012-15). Frog housing was developed in the EcoAquatron University of Lyon and approved by the Veterinary Services (approval number 692661201). All males were released to the original pond the night after the end of the experiment.

## FUNDING

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (to J.L.D., PhD grants 2012–2015) and by the Pierre Verots Foundation, the field site owner, for allowing us access to study the population.

We thank Angeline Clair and Gladys Mialdea for their technical assistance in the EcoAquatron; Albane Rives, Louise Ducroix, and Morgane Couchet for their help with fieldwork and animal housing; and Elsevier for English corrections.

**Handling editor:** Alexei Maklakov

## REFERENCES

- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Sorci G. 2007. Energetic reserves, leptin and testosterone: a refinement of the immunocompetence handicap hypothesis. *Biol Lett.* 3:271–274.
- Andersson M. 1994. Sexual selection. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Arch VS, Narins PM. 2009. Sexual hearing: the influence of sex hormones on acoustic communication in frogs. *Hear Res.* 252:15–20.
- Berger S, Martin LB, Wikelski M, Romero LM, Kalko EKV, Vitousek MN, Rodl T. 2005. Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Horm Behav.* 47:419–429.
- Blas J, Perez-Rodriguez L, Bortolotti GR, Vinuela J, Marchant TA. 2006. Testosterone increases bioavailability of carotenoids: insights into the honesty of sexual signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18633–18637.
- Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. 2002. Leptin and reproduction. *Steroids.* 67:95–104.
- Brepson L, Voituron Y, Lengagne T. 2013. Condition-dependent ways to manage acoustic signals under energetic constraint in a tree frog. *Behav Ecol.* 24:488–496.
- Buchanan KL. 2000. Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends Ecol Evol.* 15:156–160.
- Buchanan KL, Evans MR, Goldsmith AR. 2003. Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behav Ecol Sociobiol.* 55:50–59.
- Candolin U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biol Rev.* 78:575–595.
- Cox RM, Zilberman V, John-Alder HB. 2008. Testosterone stimulates the expression of a social color signal in yarrow's spiny lizard, *Sceloporus jarrovi*. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 309:505–514.
- Deviche P, Cortez L. 2005. Androgen control of immunocompetence in the male house finch, *Carpodacus mexicanus* Muller. *J Exp Biol.* 208:1287–1295.
- Enstrom DA, Ketterson ED, Nolan V. 1997. Testosterone and mate choice in the dark-eyed junco. *Anim Behav.* 54:1135–1146.
- Evans MR, Goldsmith AR, Norris SRA. 2000. The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behav Ecol Sociobiol.* 47:156–163.
- Faivre B, Gregoire A, Preault M, Cezilly F, Sorci G. 2003. Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science.* 300:103.
- Folstad I, Karter AJ. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am Nat.* 139:603–622.
- Getty T. 1998. Handicap signalling: when fecundity and viability do not add up. *Anim Behav.* 56:127–130.
- Gingras B, Boeckle M, Herbst C, Fitch W. 2013. Call acoustics reflect body size across four clades of anurans. *J Zool.* 289:143–150.
- Gomez D. 2006. AVICOL, a program to analyse spectrometric data. Available from: <http://sites.google.com/site/avicolprogram/mailto>: (accessed October 2013).
- Gomez D, Richardson C, Lengagne T, Derex M, Plenet S, Joly P, Lena JP, Thery M. 2010. Support for a role of colour vision in mate choice in the nocturnal European treefrog (*Hyla arborea*). *Behaviour.* 147:1753–1768.
- Gomez D, Richardson C, Lengagne T, Plenet S, Joly P, Lena JP, Thery M. 2009. The role of nocturnal vision in mate choice: females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 276:2351–2358.
- Gomez D, Richardson C, Thery M, Lengagne T, Lena JP, Plenet S, Joly P. 2011. Multimodal signals in male European treefrog (*Hyla arborea*) and the influence of population isolation on signal expression. *Biol J Linn Soc.* 103:633–647.
- González-Tokman DM, Munguia-Steyer R, González-Santoyo I, Baena-Díaz FS, Córdoba-Aguilar A. 2012. Support for the immunocompetence handicap hypothesis in the wild: hormonal manipulation decrease survival in sick Damsselfies. *Evolution.* 66:3294–3301.
- Hoskin CJ, James S, Grigg GC. 2009. Ecology and taxonomy-driven deviations in the frog call-body size relationship across the diverse Australian frog fauna. *J Zool.* 278:36–41.
- Janin A, Lena JP, Deblois S, Joly P. 2012. Use of stress-hormone levels and habitat selection to assess functional connectivity of a landscape for an amphibian. *Conserv Biol.* 26:923–931.
- Josserand R, Troianowski M, Grolet O, Desprat JL, Lengagne T, Mondy N. 2015. A phytohaemagglutinin challenge test to assess immunocompetence of European tree frog *Hyla arborea*. *Amphibia-Reptilia.* doi:10.1163/15685381-00002983.
- Kennedy M, Nager R. 2006. The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol.* 21:653–655.
- Leary CJ. 2009. Hormones and acoustic communication in anuran amphibians. *Integr Comp Biol.* 49:452–470.
- Liang KY, Zeger SL. 1986. Longitudinal data analysis using generalised linear-models. *Biometrika.* 73:13–22.
- Lindsay WR, Webster MS, Varian CW, Schwabl H. 2009. Plumage colour acquisition and behaviour are associated with androgens in a phenotypically plastic tropical bird. *Anim Behav.* 77:1525–1532.
- Maddison CJ, Anderson RC, Prior NH, Taves MD, Soma KK. 2012. Soft song during aggressive interactions: seasonal changes and endocrine correlates in song sparrows. *Horm Behav.* 62:455–463.

- Maynard Smith J, Harper DGC. 1995. Animal signals: models and terminology. *J Theor Biol.* 177:305–311.
- McCullagh P, Nelder JA. 1989. Generalized linear models. 2nd ed. London: Chapman and Hall. p. 511.
- Neff BD, Pitcher TE. 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Mol Ecol.* 14:19–38.
- Norris K, Evans MR. 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav Ecol.* 11:19–26.
- Owen-Ashley NT, Hasselquist D, Wingfield JC. 2004. Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *Am Nat.* 164:490–505.
- Pasch B, George AS, Campbell P, Phelps SM. 2011. Androgen-dependent male vocal performance influences female preference in Neotropical singing mice. *Anim Behav.* 82:177–183.
- Pearson BL, Judge PG, Reeder DM. 2008. Effectiveness of saliva collection and enzyme-immunoassay for the quantification of cortisol in socially housed baboons. *Am J Primatol.* 70:1145–1151.
- Peters A. 2000. Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetent. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 267:883–889.
- Pigeon G, Belisle M, Garant D, Cohen AA, Pelletier F. 2013. Ecological immunology in a fluctuating environment: an integrative analysis of tree swallow nestling immune defense. *Ecol Evol.* 3:1091–1103.
- R Development Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org>.
- Remy A, Gregoire A, Perret P, Doutrelant C. 2010. Mediating male–male interactions: the role of the UV blue crest coloration in blue tits. *Behav Ecol Sociobiol.* 64:1839–1847.
- Richardson C, Joly P, Lena JP, Plenet S, Lengagne T. 2010. The challenge of finding a high-quality male: a treefrog solution based on female assessment of male calls. *Behaviour.* 147:1737–1752.
- Richardson C, Lena JP, Joly P, Lengagne T. 2008. Are leaders good mates? A study of call timing and male quality in a chorus situation. *Anim Behav.* 76:1487–1495.
- Richardson C, Lengagne T. 2010. Multiple signals and male spacing affect female preference at cocktail parties in treefrogs. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 277:1247–1252.
- Roberts ML, Buchanan KL, Bennett ATD, Evans MR. 2007. Mate choice in zebra finches: does corticosterone play a role? *Anim Behav.* 74:921–929.
- Roberts ML, Buchanan KL, Evans MR, Marin RH, Satterlee DG. 2009. The effects of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *J Exp Biol.* 212:3125–3131.
- Roberts ML, Buchanan KL, Hasselquist D, Evans MR. 2007. Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. *Horm Behav.* 51:126–134.
- Salvador A, Veiga JP, Martin J, Lopez P, Abellanda M, Puerta M. 1996. The cost of producing a sexual signal: testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasitic infestation. *Behav Ecol.* 7:145–150.
- Stoehr AM, Hill GE. 2001. The effects of elevated testosterone on plumage hue in male House Finches. *J Avian Biol.* 32:153–158.
- Szamado S. 1999. The validity of the handicap principle in discrete action-response games. *J Theor Biol.* 198:593–602.
- Taff CC, Steinberger D, Clark C, Belinsky K, Sacks H, Freeman-Gallant CR, Dunn PO, Whittingham LA. 2012. Multimodal sexual selection in a warbler: plumage and song are related to different fitness components. *Anim Behav.* 84:813–821.
- Vinkler M, Albrecht T. 2011. Handling ‘immunocompetence’ in ecological studies: do we operate with confused terms? *J Avian Biol.* 42:490–493.
- Vinkler M, Bainova H, Albrecht T. 2010. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Funct Ecol.* 24:1081–1086.
- Voituron Y, Brepson L, Richardson C, Joly P, Lengagne T. 2012. Energetics of calling in the male treefrog *Hyla arborea*: when being large means being sexy at low cost. *Behaviour.* 149:775–793.
- Zahavi A. 1977. Cost of honesty – (further remarks on handicap principle). *J Theor Biol.* 67:603–605.

### **Article 3 : Caloric restriction and testosterone affect mitochondrial functioning and contractile properties of calling muscles in *Hyla arborea***

**Desprat J.L.**, Teulier L., Puijalon S., Romestaing C., Dumet A., Lengagne T., and Mondy N.

*Journal of experimental biology*, soumis septembre 2015.

#### **Problématique :**

Chez les amphibiens, les vocalises jouent un rôle important dans le choix du partenaire au moment de reproduction. D'un point de vue physiologique, la production acoustique nécessite la contraction des muscles du tronc afin de chasser l'air des poumons jusqu'à la cavité buccale. Due à la grande fréquence de contraction des muscles du tronc, la production acoustique augmente le métabolisme aérobie de l'animal et l'activité des enzymes présentes sur la chaîne respiratoire mitochondriale.

Au cours de la saison de reproduction les mâles présentent une hausse significative de leur taux de testostérone qui est connue pour affecter directement le signal acoustique (voir article 2). Par ailleurs, les propriétés de contraction des muscles responsables du chant chez les grenouilles sont souvent impactées par cette hormone. D'autre part sur la mare, les mâles chanteurs n'allouent que très peu de temps à la recherche de nourriture. L'énergie nécessaire au chant est donc directement liée à l'utilisation de leurs réserves, ils peuvent donc être considérés comme expérimentant une période de restriction calorique.

#### **Objectifs :**

L'objectif est d'étudier expérimentalement les effets de la testostérone et de la restriction calorique sur les muscles du tronc de la rainette *H. arborea*. Pour la première fois, nous avons étudié les réponses à ces contraintes à différents niveaux d'intégration sur les mêmes individus 1) les caractéristiques des signaux acoustiques, 2) l'activité des muscles du tronc et 3) le fonctionnement mitochondrial.

#### **Hypothèses :**

- H1 : les propriétés contractiles des muscles du tronc et le fonctionnement mitochondrial sont améliorés par la testostérone.
- H2 : la restriction calorique implique une augmentation de l'efficacité des mitochondries.

#### **Méthodes :**

Nous avons expérimentalement manipulé le taux de testostérone chez 40 mâles *H. arborea* par application topique d'une solution avec ou sans testostérone à une concentration de 3 mg/ml. Après avoir enregistré leurs chants, les individus sont euthanasiés. Les propriétés contractiles des muscles sont mesurées suite à une stimulation électrique de 0.5 ms à 20 Hz

provoquant un tétanos musculaire. Le fonctionnement mitochondrial est évalué par la consommation d'oxygène des fibres musculaires.

### **Résultats :**

- La contraction musculaire tétanique induite présente une force maximale atteinte rapidement (quelques secondes) puis une diminution progressive de la force formant un plateau.
- La testostérone réduit la durée du plateau de contraction ainsi que la consommation d'oxygène des fibres musculaires à l'état phosphorylant. Sur un substrat lipidique, la consommation d'oxygène allouée à la production d'ATP est réduite par la testostérone.
- La restriction calorique réduit la force de contraction des muscles du tronc et augmente l'efficacité mitochondriale en limitant la fuite de proton de la chaîne respiratoire mitochondriale.

### **Conclusion :**

Nos résultats montrent un effet concomitant de la testostérone et de la restriction calorique sur la bioénergétique mitochondriale et les propriétés contractiles du muscle du tronc chez les mâles *H. arborea* pendant la saison de reproduction. À consommation d'oxygène équivalente, l'augmentation de l'efficacité mitochondrial permet d'augmenter la production d'énergie utile. Au moment de la reproduction, le signal acoustique est élevé et les contractions musculaires associées sont coûteuses en énergie. L'effet positif de la testostérone sur le rendement mitochondrial pourrait permettre d'améliorer la qualité ou la quantité des chants des mâles et ainsi augmenter leur *fitness*.

# **Caloric restriction and testosterone affect mitochondrial functioning and contractile properties of calling muscles in *Hyla arborea*.**

(Soumis septembre 2015 *Journal of Experimental Biology*)

**Julia L. Desprat**, Loïc Teulier, Sara Puijalon, Caroline Romestaing, Adeline Dumet, Thierry Lengagne and Nathalie Mondy.

Université de Lyon, UMR 5023 Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, F - 69622 Villeurbanne, France.

KEY WORDS: androgen, tree frog, trunk muscle, muscular contraction, fiber bioenergetics, acoustic signal

RUNNING TITLE: Testosterone and call muscle capacities

## **SUMMARY STATEMENT**

Calling behavior is testosterone-dependent in the tree frog. Here, we investigated both the testosterone and the caloric restriction effects on the trunk muscle properties with a physiological integrative point of view.

## **ABSTRACT**

During the breeding season, the calling behavior of males is often time consuming and energy consuming. Consequently, males experience a period of caloric restriction due to both the energetic cost of calling and the reduced opportunities for foraging. In addition, the testosterone level of males is increased compared to pre- and post-reproduction. Here, we experimentally induced caloric restriction and increased the testosterone levels of the male European tree frog *Hyla arborea* to study, in realistic conditions and on the same individuals, mitochondrial activity, which provides the ATP necessary for muscle functioning, trunk-muscle activity and the resulting call. Our results show that the maximal force developed by the trunk muscle was not affected by the caloric restriction, suggesting that frogs were able to maintain force properties, even with half the muscle mass. Furthermore, the caloric restriction and testosterone significantly and positively affected the mitochondrial efficiency of the trunk-muscle fiber. The integrative character of this study allowed for the highlighting of direct relationships between mitochondrial efficiency and trunk-muscle contraction and between trunk-muscle contraction and calling behavior.

### **List of symbols and abbreviations**

|           |   |
|-----------|---|
| C-males   | control males   |
| COX       | cytochrome c oxidase  |
| D0        | day 0   |
| D10       | day 10  |
| D20       | day 20  |
| FG        | fast glycolytic   |
| FOG       | fast oxidative glycolytic                                     |
| P0        | maximal force of tetanus                                      |
| P0/M      | maximal force of tetanus relative to muscle dry mass          |
| PCM       | palmitoyl-carnitine/malate                                    |
| PMS       | pyruvate/malate/succinate                                     |
| Pt        | force at the beginning of plateau                             |
| Pt/M      | force at the beginning of plateau relative to muscle dry mass |
| RCR       | respiratory control ratio                                     |
| SO        | slow oxidative  |
| T90       | time to decrease of 90% P0                                    |
| T-males   | testosterone-supplemented males                               |
| VO2 ATP   | muscle fiber oxygen consumption estimated to ATP production   |
| VO2 basal | muscle fiber oxygen consumption with substrate only           |
| VO2 max   | muscle fiber oxygen consumption with ADP                      |
| WCR       | within-bout call rate   |

## INTRODUCTION

Male sexual traits, such as acoustic signals, tegument coloration, behavior and morphological characteristics, have been reported in various taxa to influence female mate choice (for a review, see Jennions and Petrie, 1997). Males can also use signals emitted by other males to decide on the best way to react (typically fight or flight (Arak, 1983; Andersson, 1994) or sneaking tactics (Brepson et al., 2012)). The expression of male sexual traits and behavior may ultimately be constrained by physiological limitations, such as nutritional or endocrine status, oxidative stress, or pathologies (Pough et al., 1992; Borgia, 1993; Andersson, 1994).

Vocalizations in anuran species are well described for both intra-sexual and inter-sexual competition during the breeding season (Wells, 1977; Gerhardt et al., 2007; Richardson et al., 2010). Vocal parameters that reflect signaling effort, such as the emission rate and duration of calls, are often highly variable within and among individuals and typically under strong directional selection in anurans (for a review, see Leary, 2009). Sound production in most anurans is powered by the cyclical contraction of trunk muscles — the external and internal oblique muscles — that enclose much of the thoracic and abdominal cavities (Pough et al., 1992). When a frog calls, air is forced from the lungs by the contraction of the trunk muscles and moves through the larynx into the buccal cavity. As the air passes through the larynx, the vibration of the vocal cords and associated cartilages produces sound (Pough et al., 1992; McClelland, 1996; Girgenrath and Marsh, 1997; Leary, 2009). The acoustic signals that most anurans produce are accompanied by the inflation of one or two conspicuous vocal sacs. Males inflate and deflate their vocal sac, which has a primary evolutionary function of recycling air during vocalization, thereby increasing the call rate and distributing soundwaves omnidirectionally (Pauly et al., 2006).

Acoustic signaling is thus particularly demanding for muscle activity, and the elevated metabolic rates are explained by the high levels of contractile activity in the trunk muscles (Taigen and Wells, 1985). Previous reports on many frog species show that trunk muscles exhibit variations in aerobic characteristics (Ressel, 1996; Bevier, 1997; Grafe and Thein, 2001). Aerobic muscle performance is highly contingent on the oxygen demands of mitochondrial respiratory enzymes in exercising muscles (Ressel, 1996). Relationships between calling performance and features of the trunk muscles in males have been reported in inter-specific comparisons. Neotropical frog species with high calling rates have trunk muscles with high mitochondrial densities and enzyme activity levels of catabolic enzymes such as citrate synthase (Ressel, 1996).

In many species, to achieve sexual behavior, males reduce their opportunities for foraging during the breeding season (Pough et al., 1992). Thus, they often experience a period of



caloric restriction. A significant body-mass depletion linked with calling activities during breeding season has often been observed in males (Wells, 1977; Egger and Guyétant, 2003; Girgenrath and Marsh, 2003; Meuche and Grafe, 2009). Caloric restriction could also affect their mitochondrial functioning (Putti et al., 2015). Indeed, caloric restriction is hypothesized to decrease mitochondrial electron flow and proton leaks to attenuate damages caused by reactive oxygen species (Sohal and Weindruch, 1996). Hence, caloric restriction could have beneficial effects on mitochondrial functioning.

During breeding periods, males also experience a high level of testosterone (Marler and Ryan, 1996; Desprat et al., 2015). Gonadal testosterone can provide important insights into the evolution of courtship signals because they regulate the expression of many sexually selected signals (Folstad and Karter, 1992; Wilczynski et al., 2005; Blas et al., 2006). In particular, this steroid plays an important role in the expression of acoustic sexual signals in anuran (Moore et al., 2005; Arch and Narins, 2009; Leary, 2009). The correlations reported between androgen levels and vocal persistence or effort could be explained by the physiological action of testosterone on trunk muscles and neuronal activation. For example, in gray tree frogs, *Hyla chrysoscelis*, seasonal effects on testosterone levels enhance their trunk muscle size and their *in vivo* contractile properties, and there are clear activational effects of androgens on the trunk muscles involved in producing vocalizations (Girgenrath and Marsh, 2003). Androgens (testosterone but also 5 $\alpha$ -dihydrosterone or 11-ketotestosterone) increase the size of the muscles used by males to produce song; further upstream, the brainstem and spinal cord motor neurons that control these muscles can also be androgen sensitive (for a review, see Adkins-Regan, 2005). Testosterone can strengthen the energetic challenge of male tree frogs, increasing their metabolic expenditure in a period of restrictive access to feeding resources.

The goal of the present study was to experimentally investigate the testosterone effects and the caloric restriction on the trunk muscles of the European tree frog *Hyla arborea* (Linnaeus, 1758). For the first time, we studied the same individuals' i) acoustic signals, ii) trunk muscle activity, which is largely involved in call production, and iii) mitochondrial activity, which provides the ATP necessary for muscle functioning. *H. arborea* is a lekking species, and the mating system is thus based on female choice. Males vocalize to attract females, and females compare the calling performance of several males before mating (Richardson et al., 2010). Females show a significant preference for higher call rates and higher call amplitudes (Richardson et al., 2010). Calls contain five to seven pulses corresponding to a cycle of the contraction and relaxation of the trunk muscles. Moreover, each call is emitted repeatedly with a high call rate (5-9 calls per second) in series named bouts (Gomez et al., 2011). Males can produce approximately 15000 calls during a calling night (Brepson et al., 2013).



We predicted that testosterone and caloric restriction would improve 1) trunk muscle contractile properties, particularly fatigue resistance, and 2) mitochondrial bioenergetics. Simultaneously, the loss of the male body condition could imply an increase in mitochondrial efficiency (to maintain a similar ATP production) to maintain the same muscle contractile properties throughout the breeding season. Finally, we investigated the relationships among the three levels of integration, i.e., acoustic parameters, muscle properties and mitochondrial bioenergetics.

## **METHODS**

We previously conducted an experiment focused on the relationship between testosterone, sexual signaling and immunity on 96 *H. arborea* mature males (Desprat et al., 2015). To reduce our impact on the tree frog population, the forty males used in the present study were a random subsampling of this previous study. Hence, full details of the housing conditions, the experimental design of the hormonal experiment and the call analysis can be found in Desprat et al. (2015).

### **Male capture and housing conditions**

Calling *H. arborea* males were collected during nightly choruses in mid-April 2013 from a population located in France near Lyon. After their capture, the individuals were housed in the laboratory in individual terrariums (25x17x15 cm) with a water-filled basin and a tree branch. Frog housing was developed in the EcoAquatron University of Lyon approved by the Veterinary Services (approval number 692661201). To mimic the limited foraging behavior *in natura* and the caloric restriction experienced by males in the field during breeding season, males were fed 2 crickets per day throughout the experiment.

### **Experimental design**

Experiments were conducted under the approval of the ethical committee of Lyon 1 University. The 40 males were randomly distributed in 2 groups: C-males (control males, N = 24), and T-males (testosterone-supplemented males, N = 16). Testosterone was delivered transdermally to each frog following the method used by Desprat et al. (2015). Briefly, testosterone (number 86500, FLUKA analytical, Sigma-Aldrich) was diluted in commercial-grade sesame oil to obtain a 3 mg/ml hormone solution. T-males received 4.5 µl of hormone solution dorsally each day during the experiment, whereas C-males received an identical amount of sesame oil. The first day of the experiment (D0), 8 C-males were weighed, and a saliva sample was taken to estimate testosterone levels. Their calls were recorded the night of

D0, and they were killed at the morning. The same measures were redone at ten days (D10) on 8 C-males and 8 T-males and at twenty days (D20) on 8 C-males and 8 T-males. Each individual was killed by pithing with a syringe needle.

### **Hormone analysis**

A saliva sample was obtained with a cotton ball directly introduced into a frog's mouth for 20 seconds. Cotton balls were weighed before and after sampling saliva. Then, saliva was extracted from the cotton ball with the addition of 120  $\mu$ L of a phosphate buffer (1 M phosphate solution containing 1% BSA, 4 M sodium chloride, 10 mM EDTA and 0.1% sodium azide) and centrifugation at 10 000 rpm over 10 min. The testosterone analysis was performed in duplicate with a colorimetric 96-well testosterone Enzyme-Immuno Assay kit (EIA, number 582701, Cayman Chemical). The EIA used to measure testosterone in the saliva was previously validated for use with *H. arborea* saliva (Desprat et al., 2015).

### **Recording and call analysis**

We measured individual male call characteristics by recording their acoustic response to a chorus playback in a semi-anechoic chamber (40 x 40 x 40 cm) using a Sony ECM-T6 directional microphone connected to digital recorders (Roland R-44 or Fostex FR-2LE; Fe 44.1 kHz, Thomann, France) over a 4-hour period beginning at 8.00 pm on the nights of D0, D10 and D20. Using Avisoft SASLab Pro© (Avisoft Bioacoustics, Germany), we extracted the main acoustic parameters: the average bout duration (in s), the within-bout call rate, which corresponds to the rhythm of call emission during each bout (WCR, in calls/s), and the call duration (in s). In addition, the first harmonic, which is usually the frequency with the highest energetic content of the call (named dominant frequency), was measured using a Fast Fourier Transform analysis (FFT windows size: 1024 pts; accuracy: 21.5 Hz).

### **Measures of trunk muscle contractile properties**

The anuran trunk muscles originate on the vertebral spines and are inserted near the middle of the ventral surface (Girgenrath and Marsh, 2003). The whole right trunk muscle was isolated from the vertebral column to the breastbone and completely immersed vertically in a polypropylene cylindrical chamber ( $\varnothing$  x h: 4.5 cm x 6 cm) with Ringer solution (110 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 10 mM Hepes, pH 7.4) at 25°C (Allard and Rougier, 1994) and a constant supply of oxygen. The trunk muscle was allowed to recover from the dissection for approximately 30-45 min before any contractile measurements were collected. The trunk muscle was clamped to the bottom of the chamber

by the breastbone conjunctive tissues as an attachment point and by the vertebral column to the non-fixed part of the single column universal testing system (Instron 5940, Canton, MA, USA). Stimuli were produced by a stimulator (model 6002, Harvard apparatus, UK). Muscle lengths were adjusted to tend the muscle enough to measure contractions. Maximum twitch contractions were estimated by finding a threshold at an increasing voltage until no further increase was observed (between 25 V and 40 V). The muscle was supra-maximally stimulated using two copper electrodes placed along the chamber (d x L : 0.1 cm x 6 cm) with a square wave stimulus of 0.5 ms at 20 Hz until exhaustion. From this tetanus (Fig. 1), we calculated the following variables : the maximal force relative to muscle dry mass ( $P_0/M$ , in mN/mg), the time to a decrease of 90% of  $P_0$  ( $T_{90}$ , in s), the force relative to muscle dry mass corresponding to the beginning of the plateau ( $P_t/M$ , in N/mg) and the plateau duration (in s).

### **Measures of mitochondrial functioning**

- ***Permeabilized muscle fibers preparation and respiration***

Muscle fibers' bioenergetics was investigated using a method previously described by Pesta and Gnaiger (2012). Immediately after euthanasia, half of the left trunk muscle was frozen, and the rest was immersed and dissected in BIOPS solution (10 mM Ca-EGTA buffer, 0.1  $\mu$ M free calcium, 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 50 mM K-MES, 0.5 mM DTT, 6.56 mM  $MgCl_2$ , 5.77 mM ATP, 15 mM phosphocreatine, pH 7.1). Muscle strips were dissected to separate muscle fibers. Fiber bundles were transferred in a BIOPS solution containing saponin (50  $\mu$ g/ml) for permeabilization and were shook gently at 4°C for 30 min. Then, permeabilized fibers were washed for 10 min at 4°C in the Mir05 buffer (0.5 mM EGTA, 3 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM  $KH_2PO_4$ , 20 mM Hepes, 110 mM sucrose, free fatty acid BSA (1 g/L), pH 7.1). Muscle fibers were weighed, and their respiration rate was monitored with an Oroboros® oximeter at 20°C, in the Mir05 solution using either Pyruvate/Malate/Succinate (PMS: 5/2.5/5 mM) or Palmitoyl-carnitine/Malate (PCM : 40/2.5 mM) as a substrate to initiate a non-phosphorylating state ( $VO_2$  basal, see table 4). The phosphorylating state ( $VO_2$  max) was determined in the presence of ADP (1 mM). The difference between the two states ( $VO_2$  ATP) corresponds to the estimated part (without leaks) of the respiration allocated to the ATP production. In addition we calculated the respiratory control ratio (RCR) as «  $VO_2$  max/ $VO_2$  basal ». The integrity of mitochondria within permeabilized fibers was systematically verified by the absence of the stimulation of respiration by cytochrome c (10  $\mu$ M) addition. The results are expressed in pmol oxygen/s/mg tissue.

- **Cytochrome c oxidase (COX) activity**

The COX activity was used as a proxy of the mitochondrial quantity in the tissue. Fragments of the frozen left trunk muscle of each frog (10-20 mg) were homogenized in 1 mL of modified Chappel and Perry medium (1 mM ATP, 50 mM Hepes, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, pH 7.4). The homogenate was then diluted 1:2 (v/v) in the same medium with lubrol (10 mg/ml) to unmask tissue enzyme activity. Samples were incubated on ice for 30 min. Then, the COX activity was measured polarographically at 20 °C using an Oroboros® oximeter. Tissue homogenate was added to 2 ml of reaction medium (30 µM cytochrome c, 4 µM rotenone, 0.5 mM dinitrophenol, 10 mM Na-malonnate, 75 mM Hepes, pH 7.4). The reactions were initiated by the addition of substrates (4 mM sodium ascorbate with 0.3 mM N, N-N'-tetramethyl-p-phenylene-diamine). The Cox activity is expressed in pmol/s/mg tissue.

### Statistics

The data are expressed as the means  $\pm$  s.e.m in all figures. The T90 data were log-transformed to meet model requirements (normality and homoscedasticity variance structure). ANOVA was performed on C-males without T-males to evaluate the day effect throughout the experiment (D0/D10/D20). The treatment effect on time was evaluated with a two-way ANOVA with two fixed variables, « day » (2 modalities: D10 and D20) and « treatment » (2 modalities: C-males and T-males). It should be noted that one of the C-males at D20 presented outlier testosterone levels (65.82 pg/mg, *Chi-squared* = 6.10, *P* = 0.01). This value was excluded from the dataset.

We checked that the initial tension of the trunk muscle before the stimulation was not dependent on the day throughout the experimentation (lm, day effect, *df* = 2, *F* = 2.22, *P* = 0.12). This allowed us to compare measures between days.

To understand the underlying mechanism of the males' calling performances, links among the variables of mitochondrial respiration, contractile properties and acoustic performance of males were performed with a Pearson correlation coefficient. One of C-males at D0 presented an outlier bout duration (6.7 s, *Chi-squared* = 8.46, *P* = 0.004), which was excluded from the dataset.

The data were analyzed using the statistical software package R.3.2.1 (R Development Core Team, 2013).

## RESULTS

### Testosterone levels in saliva

At the beginning of the experiment, the testosterone level of *H. arborea* males was  $6.18 \pm 0.82$  pg/mg of saliva (mean  $\pm$  s.e.m). Over the 20 days of experimentation, the testosterone level did not vary in the control group (C-males, lm, day,  $df = 2$ ,  $F = 3.60$ ,  $P = 0.08$ ;  $7.01 \pm 2.12$  pg/mg and  $3.22 \pm 0.56$  pg/mg at D10 and D20, respectively). On the contrary, the saliva testosterone level of testosterone-supplied males (T-males) increased significantly — from 2.4-fold at D10 to 8.6-fold at D20 — compared to C-males (lm, treatment,  $df = 1$ ,  $F = 19.03$ ,  $P < 0.001$  and  $17.03 \pm 1.73$  pg/mg and  $27.69 \pm 8.78$  pg/mg of T-males' saliva at D10 and D20, respectively).

### Body mass and caloric restriction

All frog males' body masses decreased significantly during the experimentation (lm, day,  $df = 2$ ,  $F = 27.13$ ,  $P < 10^{-7}$ ). On the first day, the mean body mass of frogs was  $7.05 \pm 0.22$  g. Supplementation with testosterone did not have significant effect on body mass loss (lm, treatment,  $df = 1$ ,  $F = 0.33$ ,  $P = 0.57$ ). Pooled, C-males and T-males reached  $6.39 \pm 0.23$  g and  $4.84 \pm 0.17$  g at D10 and D20, respectively. Over the 20 days of experimentation, body mass loss due to caloric restriction increased significantly, from  $\sim 10\%$  at D10 to  $\sim 30\%$  at D20 (Fig. 2). Muscle mass, strongly correlated to body mass (Pearson,  $df = 26$ ,  $t = 6.57$ ,  $r^2 = 0.62$ ,  $P < 10^{-6}$ ), dropped 42%.

### Call parameters of *H. arborea* males

As described in a previous study (Desprat et al., 2015), 96 calling males were individually recorded over 4 hours. In the present study, 40 males were randomly sampled in this group for physiological experiments. However, although an effect of testosterone on the dominant frequency and the bout duration was found for the whole group (Desprat et al., 2015), no effect of testosterone supply was detected in our subsample, likely due to the smaller size of the group sampled (lm, treatment,  $df = 1$ , all  $P > 0.05$ ).

### Muscle contractile properties

Measures of contractile properties of the trunk muscle were effectuated with tetanus stimulation. Force and fatigue parameters were calculated as described in the Fig. 1.

According to table 1, the recorded maximal forces P0 (in mN) and force during the plateau Pt (in mN) were similar in time. However, P0/M (P0 divided by the dry muscle mass in mN/mg) and Pt/M (Pt divided by the dry muscle mass in mN/mg) increased between D10 and D20

(+94% for P0/M and +113% for Pt/M). The elevated force of the P0/M and the Pt/M was explained primarily by the muscle-mass reduction between D10 and D20 (table 1, Fig. 2). The fatigue indices (i.e., the plateau duration and T90, which represents the time of 10% P0) seemed to decrease between D10 and D20 (table 1). The plateau duration is affected by time and by treatment (table 2). T-males presented a plateau duration shorter than C-males (-19% and -36% at D10 and D20, respectively, table 1). Because there was no effect of the treatment on the time corresponding to the beginning of the plateau (lm, treatment,  $df = 1$ ,  $F = 0.75$ ,  $P = 0.39$ ), the reduction of the plateau duration between treatments may be explained by an early end of the plateau for T-males (lm, treatment,  $df = 1$ ,  $F = 2.99$ ,  $P = 0.09$ ), even if the decrease of the second parameter T90 between D10 and D20 was not significant (table 2). We also associated the muscle fatigue indices and call parameters that represent the calling effort of males. Indeed, animals with the least fatigable trunk muscles (i.e., a high T90) were able to emit bouts with long durations (Pearson,  $df = 29$ ,  $t = 2.62$ ,  $P = 0.01$ ; Fig. 3).

### **Mitochondrial functioning**

Cytochrome c oxidase (COX) activity gives an estimation of a number of viable mitochondria consuming oxygen during measurement. The COX activity did not vary, regardless of the groups (tables 3-4).

To mimic different metabolic pathways, muscle fiber respiration rates were induced using carbohydrate- (PMS) or lipid-derived (PCM) energetic substrates. According to table 4, testosterone significantly reduced the VO2 max (ADP-induced respiration, corresponding to the phosphorylation state) when respirations were induced by palmitoyl-carnitine + malate (PCM) or by pyruvate/malate + succinate (PMS; -19% and -16% for PCM and PMS, respectively; table 3). Testosterone also negatively affected the VO2 basal (mitochondrial oxygen consumption due to membrane leak) with a lipid substrate (table 4). Hence, with this substrate, the respiration rate allocated to ATP phosphorylation (VO2 ATP, calculated as « VO2 max minus VO2 basal ») was significantly lower in T-males than in C-males (-16%, lm, treatment,  $df = 1$ ,  $F = 5.15$ ,  $P = 0.03$ ).

However, the respiratory control ratio (RCR, calculated as « VO2 max/VO2 basal ») increased significantly — by 40% — between D10 and D20, regardless of the substrate used. This discrepancy is more likely explained by a variation in VO2 basal than in VO2 max. Indeed, for both substrates, VO2 basal significantly decreased within 10 days (from -26% to -50% for PMS and PCM, respectively; tables 3 and 4), whereas only the VO2 max induced by PCM of C-males did vary with time (-18%, table 3).

This last parameter, VO<sub>2</sub> max, was positively correlated to fatigue indices (Fig. 4). Indeed, when muscle fiber respiration was induced with PCM, a muscle with a high VO<sub>2</sub> max was less fatigable (T90 increased) than a muscle with a lower VO<sub>2</sub> max (Pearson,  $df = 31$ ,  $t = 2.37$ ,  $P = 0.02$ , Fig. 4A). When muscle fiber respiration was induced with PMS, a muscle with a high VO<sub>2</sub> max had a longer plateau duration than a muscle with a lower VO<sub>2</sub> max (Pearson,  $df = 24$ ,  $t = 2.09$ ,  $P = 0.05$ , Fig. 4B). Notably, the VO<sub>2</sub> ATP from PCM was positively correlated to force indices, i.e., P0/M (Pearson,  $df = 28$ ,  $t = 2.33$ ,  $P = 0.03$ , Fig. 5A) and Pt/M (Pearson,  $df = 26$ ,  $t = 2.11$ ,  $P = 0.04$ , Fig. 5B).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to investigate simultaneously the effects of both caloric restriction and testosterone at three integrative levels, allowing for the connection of call performances, muscle contractile properties and mitochondrial functioning. Combined, these two experimental conditions increased the realism of our study. Both caloric restriction and testosterone improved mitochondrial efficiency. This metabolic flexibility likely allows males to handle the constraints linked to the reproduction period, such as high energetic demand for calls and low nutritional levels.

### Caloric restriction effect

In this study, we focused primarily on characterizing muscle fatigue, which is coherent with endurance-type exercise, sustained by trunk muscles, to produce mating calls in hylids. In *H. arborea*, some individuals may produce as many as 32000 calls per night, but producing 11500 calls is more typical (Brepson et al., 2013). Because the frogs maintain this level of vocal activity over several nights during the breeding season, the cost is elevated. We therefore used a tetanic stimulation to observe the decreasing pattern of muscle contractions. A pioneer study conducted on *Xenopus laevis* and *Rana pipiens* (Putnam, 1979) revealed two different patterns of tetanus tracings, depending on the fatigue state of individuals. We obtained a similar pattern in tree frogs (Fig. 1), which surprisingly overlapped with fatigued ones of *X. laevis*. This finding could be explained by the caloric restriction undergone by male tree frogs in our study. Fed with 2 crickets per day in our study, the frogs lost body mass during the experimental period, up to 30% at D20, which is consistent with a previous study conducted on the same model (Meuche and Grafe, 2009).

The trunk muscle mass of male tree frogs also massively decreased by 42% between D10 and D20. Girgenrath and Marsh (2003) also observed a decrease of 50% of the trunk muscles of postbreeding-season males compared to the trunk muscles of breeding-season males. This



finding may reflect the energetic cost of calling and the reduced opportunities for foraging during the breeding season (Pough et al., 1992). Surprisingly, however, in our study, the maximal force developed by the trunk muscle ( $P_0$  in mN) was not affected by the caloric restriction, suggesting that frogs were able to maintain some contractile properties (force), even with only half their muscle mass. The increase of  $P_0/M$ , expressed in mN/mg, is therefore explained by the decrease in muscle mass.

The effects of caloric restriction are well described for mitochondria throughout the literature; for example, it increases mitochondria biogenesis (Lopez-Lluch et al., 2006). In our study, there was no difference in COX activity, suggesting an invariable level of mitochondrial biogenesis throughout the experiment. However, focusing on other mitochondria characteristics, such as the coupling level indicated by the respiratory control ratio (RCR;  $VO_2 \text{ max}/VO_2 \text{ basal}$ ), the caloric restriction significantly and positively affected the efficiency of the mitochondria. Indeed, as the RCR increases, the mitochondria become better coupled. Because of its calculation, the RCR may increase due to either a higher  $VO_2 \text{ max}$  or a lower  $VO_2 \text{ basal}$ . In our case, at D20, males had a higher RCR (see table 3) than males at D10, and this discrepancy was explained primarily by a lower basal respiration rate.  $VO_2 \text{ basal}$  was actually lower at D20 than at D10, whereas  $VO_2 \text{ max}$  did not change. This result was clearly in accordance with the fact that caloric restriction limits membrane proton leaks to enhance mitochondrial efficiency, in other words, to limit wasted energy. This type of saving mechanism was commonly described in amphibian coping with fasting (Trzcionka et al., 2008), cold hibernating (Boutilier and St Pierre, 2002) or burrowing aestivation periods (Kayes et al., 2009). Indeed, amphibians seem to be able to modulate their mitochondrial efficiency to cope with ecological constraints.

### **Testosterone effect**

The 8.6-fold increase in testosterone due to exogenous supplementation at D20 was in the natural range of the field hormone levels measured during the breeding season (Desprat et al., 2015). Although several *H. arborea* call parameters were testosterone dependent (Desprat et al., 2015), our results failed to show a testosterone effect on call parameters, likely due to a subsampling effect. In addition, because of the caloric restriction, our results did not show any testosterone effect on body mass or muscle mass. Only with testosterone supplementation, Girgenrath and Marsh (2003) showed a 2.2-fold increase in trunk muscle mass between control and treated *H. chrysoscelis*, and they highlighted a positive testosterone effect on muscle contractile properties.



We, however, detected an effect of testosterone on the plateau duration of muscle contraction, a fatigue index, which was significantly shorter for T-males than C-males. This result was unexpected, according to the large amount of studies that show that testosterone enhances muscles' aerobic capacities (reviewed in Traish et al., 2011). The plateau duration could represent the contractile capacity of different fiber isoforms. Indeed, many studies have related the three classic isoforms of muscle fibers in anurans, i.e. fast glycolytic (FG), fast oxidative glycolytic (FOG) and slow oxidative (SO) fibers (Lutz and Lieber, 2000; Nagesser et al., 1992; Putnam and Bennett, 1983). The trunk muscle seems to be exclusively composed of FOG fibers (Marsh and Taigen, 1987), which can explain the limited effect of testosterone only on plateau duration. Testosterone actually modifies SO to FOG fibers but also modifies FG to FOG fibers in rat muscle (Egginton, 1987, see also in anoles, Holmes et al., 2007).

In addition, testosterone significantly reduced the mitochondrial oxygen consumption of the phosphorylation state when respirations were induced by lipid-derived or glucid-derived substrates. Testosterone also negatively affected mitochondrial oxygen consumption due to a membrane leak with a lipid substrate. Reduced oxygen consumption may imply a reduced reactive oxygen species production by mitochondria. Indeed, androgens regulate fuel metabolism through mitochondrial function and modulate mitochondrial biogenesis, the expression of mitochondrial enzymes, and oxidative phosphorylation (see review in Traish et al., 2011). As a consequence, the increased testosterone levels in male frogs during breeding season may allow for better mitochondrial efficiency.

### **Integrative study**

One of the main interests of this study is its integrative character, which allowed it 1) to show the positive effect of mitochondrial efficiency on muscle contractile properties and 2) to highlight the relationship between muscle contraction and emitted calls, independently of testosterone and caloric restriction. Indeed, the positive relationship between the bout duration, which is a valuable proxy of the global calling effort, and fatigue clue T90 gave a direct link between acoustic signal production ability and trunk-muscle properties. Males with the least fatigable muscles presented long bout durations. This correlation was also found by several previous studies (e.g. Martin, 1971; McIister et al., 1995; Girgenrath and Marsh, 1997; Girgenrath and Marsh, 1999; Marsh, 1999). It is also important to note that the fatigue indices (T90 and plateau duration) were also positively correlated to the mitochondrial phosphorylation respiration rate (VO<sub>2</sub> max, Fig. 4). Together, our results suggest that a higher capacity to produce cellular energy enhances muscle fatigue resistance to allow male tree frogs to emit better mating calls. It is well known that producing calls is extremely costly for

anurans (Taigen et al., 1985; Ryan, 1986), leading to a 18-fold increase in the metabolic rate for *H. arborea* (Grafe and Thein, 2001; Voituron et al., 2012). A functional link between mitochondria volume and levels of sustained contractile activity was associated with species-specific calling effort (Ressel, 1996).

Although the whole-organism metabolic rate was not assessed in this study, fatigue resistance is undoubtedly linked to better aerobic capacities. Usually, aerobic capacities are improved by training. This is the reason why we used lipid-derived substrates to mimic the main energetic pathways, fueling an endurance exercise (Bevier et al., 1997). *In vitro*, muscle fibers' respiration rates were in the same scale range, suggesting an equal capacity to oxidize lipids and carbohydrates. By contrast, the *in vivo* results based on the respiratory quotient showed a preference for carbohydrate utilization in calling *H. arborea* (Grafe and Thein, 2001). The difference could be explained by the relative mass of trunk muscle compared to locomotion muscles. Indeed, even though trunk muscles have a better aerobic capacity (as shown by a 6-fold higher citrate synthase activity) than leg muscles (Taigen et al., 1985), they represent only ~10% of the total body mass of the tree frog (our data).

The link between muscle capacity and cell energy production is reinforced by the positive relationship between force indices (P0/M and Pt/M) and the mitochondrial respiration strictly allocated to ATP production (VO<sub>2</sub> ATP, Fig. 5). Hence, the force of the contraction depended on the energy production of the muscle cells. Indeed, myofibrillar ATPase activities in the flexor carpi of *Rana temporaria* have been reported to be altered along with contractile properties (Melichna et al., 1972).

## Conclusions

Because anurans are small vertebrates that can be studied in a laboratory and in the field, they allow us the possibility to integrate behavioral, morphological and physiological studies into an interdisciplinary approach. Our study highlighted the physiological relationships between the mitochondrial respiration and contractile properties of the trunk muscle involved in call production. In addition, our results show a concomitant effect of testosterone and caloric restriction on the mitochondrial bioenergetics and contractile properties of trunk muscle in *H. arborea* males during breeding season. Further studies will be necessary to discriminate both testosterone and caloric restriction effects.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the technical platform ECOAQUATRON and particularly A. Clair and G. Mialdea for technical assistance and animal care. We thank M. Couchet for her help with fieldwork

and data collection and Y. Voituren for his help and knowledge of pithing and frog dissection. We thank L. Guillard for the contraction measure device development.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JLD, SP, CR, TL, LT and NM contributed to conception, design, and interpretation of this experiment, drafting and revision of the article. A.D. contributed to data collection.

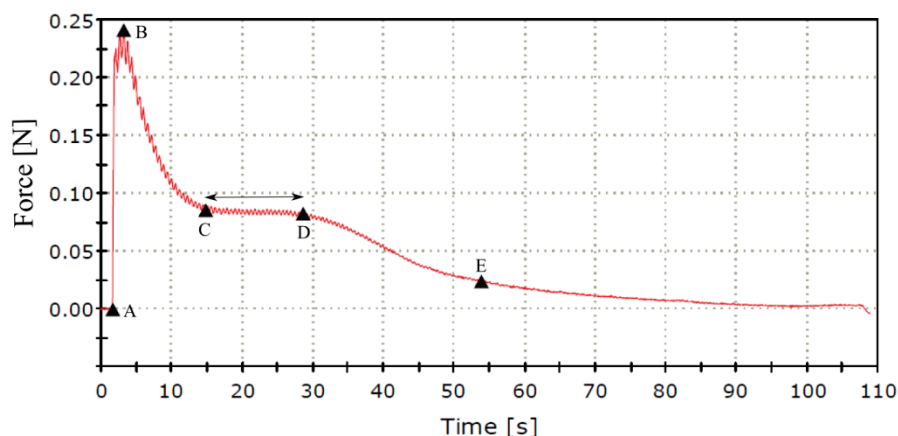
## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing or financial interests.

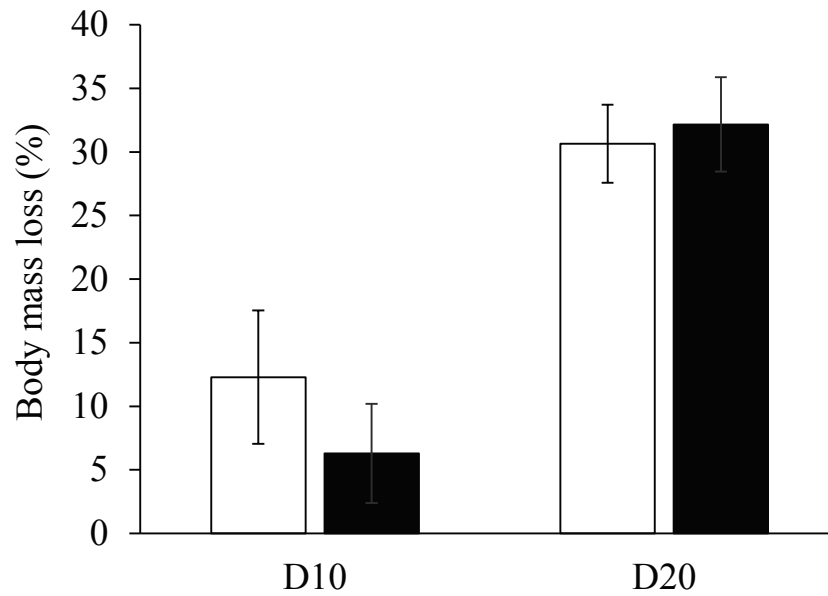
## FUNDING

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (to J.L.D., PhD grants 2012 – 2015)

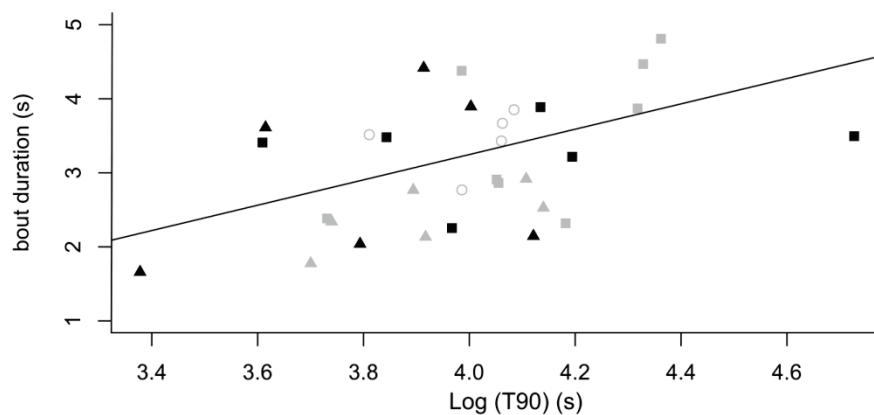
## FIGURES



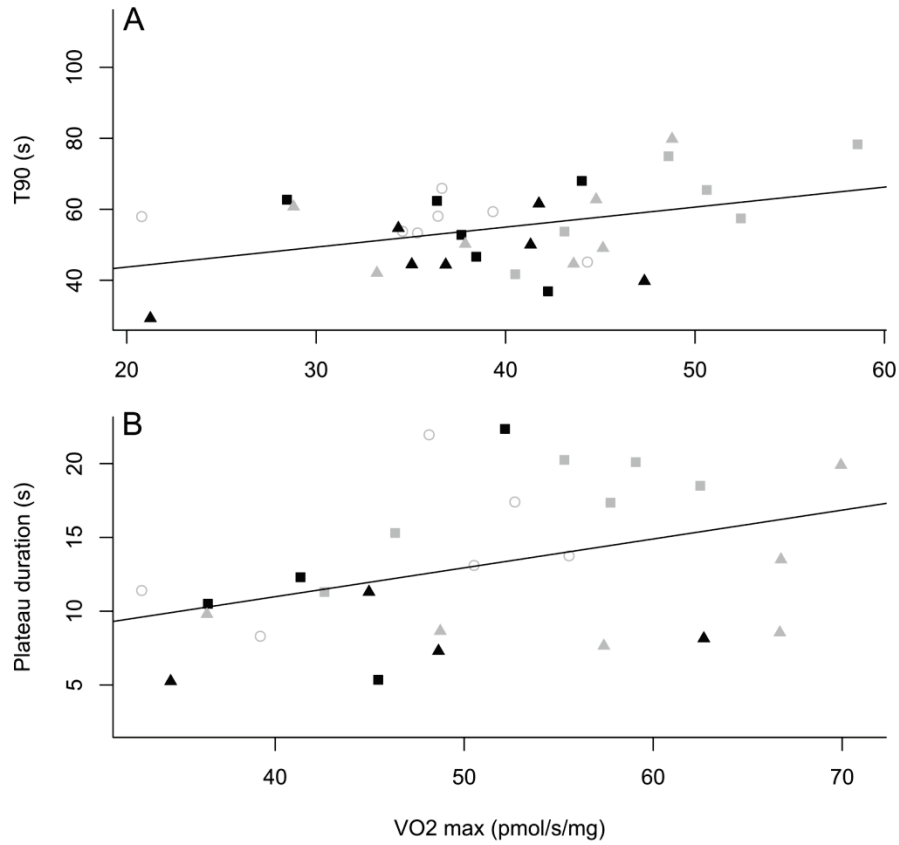
**Fig. 1: Representative tetanus trunk-muscle contraction of *H. arborea* at 20 Hz.** Force-time curves were used to define the following points : A, the initial stimuli ; B, the maximal force of the tetanus, C and D, the beginning and end of plateau respectively, and E, corresponding to a force of 10% of the maximal force. These points were used to calculate: P0: force at B, Pt: force at C; plateau duration (time at D minus time at C, indicated by an arrow) and T90, time at E.



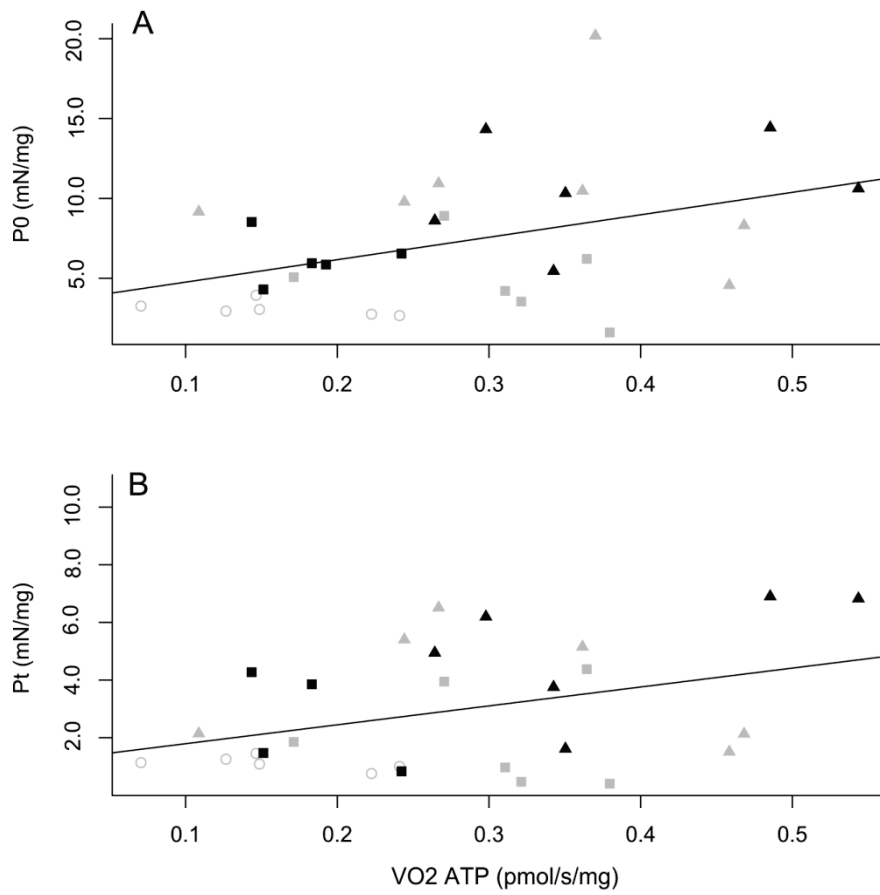
**Fig. 2: Mean body mass loss in 10 (D10) and 20 (D20) days for C-males (in white) and T-males (in black).** The body mass loss is expressed in percentage of initial body mass. During the experiment, males were feed with 2 crickets per days. Bars indicate s.e.m.



**Fig. 3: Linear regression of the indices fatigue of trunk-muscle contraction properties versus acoustic parameters of *H. arborea* males.** T90 is the time to decrease 90% the maximal force of contraction; the equation of line A is  $y = 1.42x - 2.52$ ,  $r^2 = 0.44$ . Each point represents a single male. C-males are represented in grey, T-males in black. Open circles for D0, squares for D10 and triangles for D20.



**Fig. 4: Linear regressions of mitochondrial oxygen consumption of fiber muscle *versus* the fatigue indices of trunk-muscle contractile properties of *H. arborea* males.** The VO2 max (ADP-induced respiration) corresponds to the phosphorylation state induced by lipid-derived (A) or carbohydrate (B) energetic substrates. The equation of lines are A:  $y = 0.56x + 32.46$ ,  $r^2 = 0.39$  and B:  $y = 0.20x + 3.16$ ,  $r^2 = 0.39$ . Each point represents a single male. C-males are represented in grey, T-males in black. Open circles for D0, squares for D10 and triangles for D20.



**Fig. 5: Linear regressions of mitochondrial oxygen consumption allocated to ATP production *versus* the force indices of trunk-muscle contractile properties of *H. arborea* males.** The VO2 ATP corresponds to the oxygen consumption allocated to ATP production (VO2 max minus VO2 basal) induced by carbohydrate energetic substrates. P0/M is the maximal force of tetanus contraction (in mN/mg). Pt/M is the force at the beginning of plateau contraction (in mN/mg). The equation of lines are A:  $y = 11.40x + 0.19$ ,  $r^2 = 0.55$  and B:  $y = 21.65x + 0.20$ ,  $r^2 = 0.52$ . Each point represents a single male. C-males are represented in grey, T-males in black. Open circles for D0, squares for D10 and triangles for D20.

## TABLES

**Table 1: Mean of muscle tetanus characteristics  $\pm$  s.e.m for C-males and T-males at D10 and D20.**

|                      | D10             |                 | D20              |                  |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
|                      | C-males         | T-males         | C-males          | T-males          |
| Muscle mass (mg)     | 79.7 $\pm$ 5.6  | 85.9 $\pm$ 5.0  | 51.0 $\pm$ 4.5   | 45.4 $\pm$ 8.4   |
| P0 (mN)              | 0.41 $\pm$ 0.06 | 0.50 $\pm$ 0.08 | 0.49 $\pm$ 0.05  | 0.43 $\pm$ 0.04  |
| P0/M (mN/mg)         | 5.37 $\pm$ 0.82 | 5.46 $\pm$ 0.95 | 10.22 $\pm$ 1.58 | 10.83 $\pm$ 1.40 |
| Pt/M (mN/mg)         | 2.22 $\pm$ 0.54 | 2.23 $\pm$ 0.77 | 3.93 $\pm$ 0.74  | 5.61 $\pm$ 0.97  |
| Plateau duration (s) | 16.3 $\pm$ 1.2  | 13.1 $\pm$ 2.8  | 11.2 $\pm$ 1.6   | 7.1 $\pm$ 1.0    |
| T90 (s)              | 63.1 $\pm$ 4.5  | 63.6 $\pm$ 8.0  | 53.7 $\pm$ 4.7   | 45.2 $\pm$ 3.6   |

**Table 2: Linear model analyze of trunk-muscle contractile properties after tetanus stimulation.** P0/M is the maximal force (in mN/mg) ; Pt/M is the force corresponding at the beginning of plateau (in mN/mg) ; the plateau duration (in s) and T90 represents the muscle fatigability (in s). The independent variables tested were day (D10 and D20) and treatment (C-males and T-males). (N = 32). Df = degree of freedom. The arrows show the direction of significant variations.

|           | Df | P0/M     |                            | Pt/M     |                | Plateau duration |                            | log (T90) |               |
|-----------|----|----------|----------------------------|----------|----------------|------------------|----------------------------|-----------|---------------|
|           |    | $\chi^2$ | P-value                    | $\chi^2$ | P-value        | $\chi^2$         | P-value                    | $\chi^2$  | P-value       |
| Day       | 1  | 16.16    | <b>4.10<sup>-4</sup></b> ↗ | 10.92    | <b>0.003</b> ↗ | 15.37            | <b>6.10<sup>-4</sup></b> ↘ | 7.15      | <b>0.01</b> ↘ |
| Treatment | 1  | 0.09     | 0.77                       | 1.33     | 0.26           | 5.44             | <b>0.03</b> ↘              | 1.16      | 0.29          |



**Table 3: Mean of mitochondrial respiration rates  $\pm$  s.e.m for C-males and T-males at D10 and D20.**

|                       | D10       |              |  |             | D20 |              |  |              |  |
|-----------------------|-----------|--------------|--|-------------|-----|--------------|--|--------------|--|
|                       | Substrate | C-males      |  | T-males     |     | C-males      |  | T-males      |  |
|                       |           |              |  |             |     |              |  |              |  |
| COX (pmol/s/mg)       |           | 144.7 ± 10.9 |  | 161.4 ± 7.2 |     | 155.3 ± 13.6 |  | 140.1 ± 15.2 |  |
| VO2 basal (pmol/s/mg) | PMS       | 15.6 ± 0.9   |  | 15.0 ± 1.0  |     | 11.2 ± 0.9   |  | 11.3 ± 1.5   |  |
| VO2 max (pmol/s/mg)   | PMS       | 53.9 ± 3.9   |  | 44.3 ± 2.6  |     | 59.1 ± 4.7   |  | 47.7 ± 4.1   |  |
| RCR                   | PMS       | 3.7 ± 0.2    |  | 3.0 ± 0.1   |     | 5.6 ± 0.7    |  | 5.5 ± 0.5    |  |
| VO2 basal (pmol/s/mg) | PCM       | 10.0 ± 1.1   |  | 7.6 ± 0.33  |     | 5.0 ± 0.6    |  | 4.5 ± 0.5    |  |
| VO2 max (pmol/s/mg)   | PCM       | 49.0 ± 2.7   |  | 37.9 ± 2.2  |     | 40.3 ± 2.7   |  | 36.8 ± 3.1   |  |
| RCR                   | PCM       | 5.0 ± 0.3    |  | 5.0 ± 0.3   |     | 8.5 ± 0.9    |  | 8.7 ± 1.0    |  |

**Table 4: Linear model analyze of the mitochondrial respiration (oxygen consumption) on trunk permeabilized muscle fibers by using carbohydrate- (PMS) or lipid-derived (PCM) energetic substrates.** The Cox activity is expressed in pmol/s/mg tissue, VO2 basal represents the non-phosphorylating state and VO2 max represents the phosphorylating state. The respiratory control ratio (RCR) was calculated as « VO2 max/VO2 basal ». The independent variables tested were « day » (D10 and D20) and « treatment » (C-males and T-males) (N = 32). Df = degree of freedom. The arrow shows the direction of significant variation.

|           |          |         | PMS      |         |                         |                 |                        |         | PCM                                 |         |                                     |         |                        |         |
|-----------|----------|---------|----------|---------|-------------------------|-----------------|------------------------|---------|-------------------------------------|---------|-------------------------------------|---------|------------------------|---------|
|           |          |         | COX      |         |                         | Log (VO2 basal) |                        |         | VO2 max                             |         |                                     | RCR     |                        |         |
| Df        | $\chi^2$ | P-value | $\chi^2$ | P-value | $\chi^2$                | P-value         | $\chi^2$               | P-value | $\chi^2$                            | P-value | $\chi^2$                            | P-value | $\chi^2$               | P-value |
|           |          |         |          |         |                         |                 |                        |         |                                     |         |                                     |         |                        |         |
| Day       | 1        | 0.11    | 0.74     | 10.18   | <b>0.005</b> $\searrow$ | 1.70            | 0.21                   | 17.50   | <b>6.10<sup>-4</sup></b> $\nearrow$ | 36.55   | <b>4.10<sup>-6</sup></b> $\searrow$ | 2.96    | 0.10                   | 25.36   |
| Treatment | 1        | 0.001   | 0.97     | 0.003   | 0.96                    | 6.17            | <b>0.02</b> $\searrow$ | 0.82    | 0.38                                | 4.48    | <b>0.05</b> $\searrow$              | 6.22    | <b>0.02</b> $\searrow$ | 0.02    |

## REFERENCES

- Adkins-Regan, E.** (2005). Hormones and animal social behavior. In: *Monograph in Behavior and Ecology* (ed. J.R. Krebs and T. Clutton-Brock), 411 pp. Princeton: Princeton University Press.
- Allard, B. and Rougier, O.** (1994). The effects of chloride-ions in excitation-contraction coupling and sarcoplasmic-reticulum calcium-release in twich muscle-fiber. *J. Muscle Res. Cell. M.* **15**, 563-571.
- Andersson, M. B.** (1994). *Sexual Selection*. Princeton: Princeton University Press.
- Arak, A.** (1983). Sexual selection by male-male competition in natterjack toad choruses. *Nature* **306**, 261-262.
- Arch, V. S. and Narins, P. M.** (2009). Sexual hearing: the influence of sex hormones on acoustic communication in frogs. *Hearing Res.* **252**, 15-20.
- Bevier, C. R.** (1997). Utilization of energy substrates during calling activity in tropical frogs. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **41**, 343-352.
- Blas, J., Perez-Rodriguez, L., Bortolotti, G. R., Vinuela, J. and Marchant, T. A.** (2006). Testosterone increases bioavailability of carotenoids: insights into the honesty of sexual signaling. *P. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18633-18637.
- Borgia, G.** (1993). The cost of display in the non-resource-based mating system of the Satin bowerbird *Am. Nat.* **141**, 729-743.
- Boutillier, R. G. and St-Pierre, J.** (2002). Adaptive plasticity of skeletal muscle energetics in hibernating frogs: mitochondrial proton leak during metabolic depression. *J. Exp. Biol.* **205**, 2287-2296.
- Brepson, L., Troianowski, M., Voituron, Y. and Lengagne, T.** (2012). Cheating for sex: inherent disadvantage or energetic constraint ? *Anim. Behavi.* **84**, 1253-1260.
- Brepson, L., Voituron, Y. and Lengagne, T.** (2013). Condition-dependent ways to manage acoustic signals under energetic constraint in a tree frog. *Behav. Ecol.* **24**, 488-496.
- Desprat, J. L., Lengagne, T., Dumet, A., Desouhant, E. and Mondy, N.** (2015). Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog: trade-off between sexual signals and immunity ? *Behav. Ecol.* **26**, 1138-1146.
- Eggert, C. and Guyétant, R.** (2003). Reproductive behaviour of spadefoot toads (*Pelobates fuscus*): daily sex ratios and males' tactics, ages, and physical condition. *Can. J. Zool.* **81**, 46-51.
- Egginton, S.** (1987). Effects of an anabolic hormone on striated-muscle growth and performance. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* **410**, 349-355.

- Folstad, I. and Karter, A. J.** (1992). Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am. Nat.* **139**, 603-622.
- Gerhardt, H. C., Martinez-Rivera, C. C., Schwartz, J. J., Marshall, V. T. and Murphy, C. G.** (2007). Preferences based on spectral differences in acoustic signals in four species of treefrogs (Anura : Hylidae). *J. Exp. Biol.* **210**, 2990-2998.
- Girgenrath, M. and Marsh, R. L.** (1997). *In vivo* performance of trunk muscles in tree frogs during calling. *J. Exp. Biol.* **200**, 3101-3108.
- Girgenrath, M. and Marsh, R. L.** (1999). Power output of sound-producing muscles in the tree frogs *Hyla versicolor* and *Hyla chrysoscelis*. *J. Exp. Biol.* **202**, 3225-3237.
- Girgenrath, M. and Marsh, R. L.** (2003). Season and testosterone affect contractile properties of fast calling muscles in the gray tree frog *Hyla chrysoscelis*. *Am. J. Physiol-Reg. I.* **284**, 1513-1520.
- Gomez, D., Richardson, C., Thery, M., Lengagne, T., Lena, J. P., Plenet, S. and Joly, P.** (2011). Multimodal signals in male European treefrog (*Hyla arborea*) and the influence of population isolation on signal expression. *Biol. J. Linn. Soc.* **103**, 633-647.
- Grafe, T. U. and Thein, J.** (2001). Energetics of calling and metabolic substrate use during prolonged exercise in the European treefrog *Hyla arborea*. *J. Comp. Physiol. B* **171**, 69-76.
- Holmes, M. M., Bartrem, C. L. and Wade, J.** (2007). Androgen dependent seasonal changes in muscle fiber type in the dewlap neuromuscular system of green anoles. *Physiol. Behav.* **91**, 601-608.
- Jennions, M. D. and Petrie, M.** (1997). Variation in mate choice and mating preferences : a review of causes and consequences. *Biol. Rev.* **72**, 283-327.
- Kayes, S. M., Cramp, R. L., Hudson, N. J. and Franklin, C. E.** (2009). Surviving the drought: burrowing frogs save energy by increasing mitochondrial coupling. *J. Exp. Biol.* **212**, 2248-2253.
- Leary, C. J.** (2009). Hormones and acoustic communication in anuran amphibians. *Integr. Comp. Biol.* **49**, 452-470.
- Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M. V., Allard, J., Ingram, D. K., Navas, P. et al.** (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency *P. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1768-1773.
- Lutz, G. J. and Lieber, R. L.** (2000). Myosin isoforms in anuran skeletal muscle: their influence on contractile properties and *in vivo* muscle function. *Microsc. Res. Techniq.* **50**, 443-457.
- Marler, C. A. and Ryan, M. J.** (1996). Energetic constraints and steroid hormone correlates of male calling behaviour in the tungara frog. *J. Zool.* **240**, 397-409.

- Marsh, R. L.** (1999). Contractile properties of muscles used in sound production and locomotion in two species of gray tree frog. *J. Exp. Biol.* **202**, 3215-3223.
- Marsh, R. L. and Taigen, T. L.** (1987). Properties enhancing aerobic capacity of calling muscles in gray tree frogs *Hyla versicolor*. *Am. J. Physiol.* **252**, 786-793.
- Martin, W. F.** (1971). Mechanics of sound production in toads of genus *Bufo* - passive elements. *J. Exp. Zool.* **176**, 273-294.
- McClelland, B. E., Wilczynski, W. and Ryan, M. J.** (1996). Correlations between call characteristics and morphology in male cricket frogs (*Acris crepitans*). *J. Exp. Biol.* **199**, 1907-1919.
- McLister, J. D., Stevens, E. D. and Bogart, J. P.** (1995). Comparative contractile dynamics of calling and locomotor muscles in 3 hylid frogs. *J. Exp. Biol.* **198**, 1527-1538.
- Melichna, J., Gutmann, E., Herbrychova, A. and Stichova, J.** (1972). Sexual dimorphism in contraction properties and fibre pattern of the flexor carpi radialis muscle of the frog (*Rana temporaria* L.). *Aust. Vet. J.* **48**, 89-91.
- Meuche, I. and Grafe, T. U.** (2009). Supplementary feeding affects the breeding behaviour of male European treefrogs (*Hyla arborea*). *BMC Ecology* **9** doi : 10.1186/1472-6785-9-1
- Moore, F. L., Boyd, S. K. and Kelley, D. B.** (2005). Historical perspective: hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Horm. Behav.* **48**, 373-383.
- Nagesser, A. S., Vanderlaarse, W. J. and Elzinga, G.** (1992). Metabolic changes with fatigue in different types of single muscle-fibers of *Xenopus laevis*. *J. Physiol-London* **448**, 511-523.
- Pauly, G. B., Bernal, X. E., Rand, A. S. and Ryan, M. J.** (2006). The vocal sac increases call rate in the tungara frog *Physalaemus pustulosus*. *Physiol. Biochem. Zool.* **79**, 708-719.
- Pesta, D. and Gnaiger, E.** (2012). High-resolution respirometry : OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In *Mitochondrial Bioenergetics - Methods and Protocols* (ed. C. M. Palmeira and A. J. Moreno), pp. 25-58. New York : Humana Press.
- Pough, F. H., Magnusson, W. E., Ryan, M. J., Wells, K. D. and Taigen, T. L.** (1992). Behavioral energetics. In *Environmental Physiology of Amphibians* (ed. M. E. Feder and W. N. Burggren), pp. 395-436. Chicago : University of Chicago Press.
- Putnam, R. W.** (1979). Role of lactic-acid accumulation in muscle fatigue of 2 species of anurans, *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *J. Exp. Biol.* **82**, 35-51.
- Putnam, R. W. and Bennett, A. F.** (1983). Histochemical, enzymatic, and contractile properties of skeletal-muscles of three anuran amphibians. *Am. J. Physiol.* **244**, 558-567.

- Putti, R., Sica, R., Migliaccio, V. and Lionetti, L.** (2015). Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front. Physiol.* **6**. doi : 10.3389/fphys.2015.00109
- Ressel, S. J.** (1996). Ultrastructural properties of muscles used for call production in neotropical frogs. *Physiol. Zool.* **69**, 952-973.
- Richardson, C., Joly, P., Lena, J. P., Plenet, S. and Lengagne, T.** (2010). The challenge of finding a high-quality male: a treefrog solution based on female assessment of male calls. *Behaviour* **147**, 1737-1752.
- Ryan, M. J.** (1986). Energy, calling, and selection. *Am. Zool.* **28**, 885-898.
- Sohal, R. S. and Weindruch, R.** (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **273**, 59-63.
- Taigen, T. L. and Wells, K. D.** (1985). Energetics of vocalization by an anuran amphibian (*Hyla versicolor*). *J. Comp. Physiol. B* **155**, 163-170.
- Taigen, T. L., Wells, K. D. and Marsh, R. L.** (1985). The enzymatic basis of high metabolic rates in calling frogs. *Physiol. Zool.* **58**, 719-726.
- Traish, A. M., Abdallah, B. and Yu, G.** (2011). Androgen deficiency and mitochondrial dysfunction : implications for fatigue, muscle dysfunction, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease. *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* **8**, 431-444.
- Trzcionka, M., Withers, K. W., Klingenspor, M. and Jastroch, M.** (2008). The effects of fasting and cold exposure on metabolic rate and mitochondrial proton leak in liver and skeletal muscle of an amphibian, the cane toad *Bufo marinus*. *J. Exp. Biol.* **211**, 1911-1918.
- Voituron, Y., Brepson, L., Richardson, C., Joly, P. and Lengagne, T.** (2012). Energetics of calling in the male treefrog *Hyla arborea*: when being large means being sexy at low cost. *Behaviour* **149**, 775-793.
- Wells, K. D.** (1977). Social-behavior of anuran amphibians. *Anim. Behav.* **25**, 666-693.
- Wilczynski, W., Lynch, K. S. and O'Bryant, E. L.** (2005). Current research in amphibians: studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Horm. Behav.* **48**, 440-450.

## **Rapport 4 : Couleur du sac vocal et effet de la testostérone sur les flux de caroténoïdes**

**Desprat J.L.**, Bellvert F., Lengagne T., et Mondy N.

### **Problématique :**

Les signaux sexuels colorés sont utilisés par de nombreuses espèces dans la communication inter-sexuelle au moment de la reproduction. Dans de nombreux cas, la couleur rouge orangé des ornements est liée à la présence en pigments caroténoïdes dans les téguments ou les phanères. D'un autre côté, l'expression des signaux sexuels peut aussi être testostérone-dépendante. De par son effet immunosuppresseur, la testostérone peut être vue comme le médiateur de l'honnêteté des signaux sexuels selon l'hypothèse d'immunocompétence handicap proposé par Folstad et Karter (1992). Les pigments caroténoïdes, non synthétisable *de novo* par l'organisme, sont également connus pour leurs propriétés antioxydantes dans le système immunitaire. Blas et al. (2006) supposent que la réallocation des caroténoïdes dans le plasma permettrait de tamponner l'effet immunosuppresseur de la testostérone. De fait, les mâles les plus colorés seraient ceux capables de continuer d'allouer des caroténoïdes à la fonction d'ornementation plutôt qu'à la fonction immunitaire.

### **Objectifs :**

Le premier objectif de cette étude est d'identifier les caroténoïdes présents dans 3 compartiments d'intérêt : le foie (formes de stockage), le plasma (formes circulantes) et le sac vocal (fonction ornementation). Le second objectif est de comprendre le mécanisme par lequel la testostérone permet de maintenir une coloration du sac vocal foncé dans l'étude de l'article 2.

### **Hypothèses :**

- H1 : le foie est l'organe de stockage des caroténoïdes avec la plus grande quantité de caroténoïdes ;
- H2 : la testostérone augmente la couleur du sac vocal et la quantité de caroténoïdes dans le plasma ;
- H3 : la quantité de caroténoïdes dans le plasma est responsable de la couleur du sac vocal.

### **Méthodes :**

Nous avons expérimentalement manipulé le taux de testostérone chez 40 mâles *H. arborea* par application topique d'une solution avec ou sans testostérone à une concentration de 3 mg/ml. Après que la couleur de leur sac vocal ait été mesurée, les individus sont euthanasiés. Les caroténoïdes sont extraits du plasma, du sac vocal et du foie avant d'être

analysés par UHPLC-ACPI-MS. Les caroténoïdes sont séparés sur une colonne C30 et détectés à 450 nm par le détecteur à UV.

### **Résultats :**

- Parmi les 53 composés biochimiques enregistrés, 13 ont été identifiés comme étant des caroténoïdes par leur spectre UV. Le caroténoïde majoritaire est la all-*trans*-lutéine dans les 3 compartiments. Les 3 compartiments physiologiques ont une composition en caroténoïdes spécifique ;
- Le foie contient 12 fois plus de caroténoïdes que le sac vocal et 53 fois plus que le plasma ;
- La testostérone n'a pas d'effet significatif sur les variations de caroténoïdes entre les compartiments ;
- La couleur du sac vocal est corrélée avec la quantité de caroténoïdes dans le plasma.

### **Conclusion :**

Pour la première fois chez *H. arborea*, les caroténoïdes du foie, du plasma et du sac vocal ont été identifiés. La composition en caroténoïdes est spécifique à chaque compartiment physiologique ce qui suggère une répartition selon la fonction, le foie pour le stockage, le plasma pour les formes circulantes et le sac vocal pour une fonction d'ornementation. La couleur du sac vocal est également liée à quantité relative de caroténoïde dans le plasma ce qui suggère une forte mobilité en caroténoïde entre les deux compartiments. Dans notre étude, la testostérone ne semble pas influencer la répartition des caroténoïdes entre les différents compartiments physiologiques. Peut-être la testostérone limiterait-elle la dégradation des caroténoïdes du sac vocal plutôt que de favoriser la réallocation des caroténoïdes du foie vers le sac vocal pour maintenir la coloration des mâles dans l'article 2. Des analyses complémentaires seraient nécessaires pour tester cette hypothèse.



# Couleur du sac vocal et effet de la testostérone sur les flux de caroténoïdes

Desprat J.L., Bellvert F., Lengagne T., et Mondy N.

## INTRODUCTION

Chez de nombreuses espèces, les signaux sexuels colorés émis par les mâles sont des critères de sélection du partenaire par la femelle (par exemple, les crabes : Todd et al., 2011 ; les mantes religieuses : Barry et al., 2015 ; les grenouilles : Starnberger et al., 2014 ; les poissons : Kodric-Brown et Nicoletto, 2001 ; les oiseaux : Karubian et al., 2011). La couleur rouge orangé des ornements est principalement liée à la présence de pigments de type caroténoïde dans les téguments ou les phanères (Alonso-Alvarez et al., 2004 ; Baeta et al., 2008 ; Juola et al., 2008). Les caroténoïdes représentent un très grand groupe de composés naturels avec une grande diversité de structures, toujours sur la base d'une chaîne de 40 atomes de carbone (Olson et Owens, 1998). Selon leur composition chimique, ils sont classés comme étant des carotènes ou des xanthophylles. Le  $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène et le lycopène font partie du groupe des carotènes qui comprend des caroténoïdes composés uniquement de carbone et d'atomes d'hydrogène. Les xanthophylles sont composées d'au moins un atome d'oxygène. La zeaxanthine, la lutéine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine sont des xanthophylles importantes avec des groupes hydroxy et cétone comme éléments de structure (Stahl et Sies, 2005). Les caroténoïdes peuvent être synthétisés par les plantes, les levures, les algues, les champignons et les bactéries mais ne sont pas synthétisables *de novo* par les vertébrés qui doivent les acquérir par leur alimentation (Olson et Owens, 1998). Au-delà de leur rôle pigmentaire évident, ces molécules sont des précurseurs de la vitamine A nécessaire à la vision et au fonctionnement des photorécepteurs. De plus, il a été prouvé que les caroténoïdes circulants minimisent le stress oxydatif par leurs propriétés antioxydantes et immuno-stimulantes (Chew et Park, 2004). Ainsi, plusieurs études ont-elles mis en évidence l'existence d'un compromis pour l'allocation de ces molécules entre la fonction ornementale et le système immunitaire et/ou les défenses antioxydantes (McGraw et Ardia, 2003 ; Alonso-Alvarez et al., 2004 ; Blas et al., 2006). Les signaux caroténoïdes-dépendants émis par les mâles pourraient donc être utilisés par les femelles comme des indicateurs fiables de l'état sanitaire des individus (Hill 1991 ; Grether 2000 ; Velando et al., 2006).

Le rôle de la testostérone dans l'expression des signaux sexuels a été suggéré pour expliquer le mécanisme de l'honnêteté des signaux sexuels dans l'hypothèse du handicap immunitaire proposé par Folstad et Karter (1992). D'un côté, la testostérone augmente

l'expression des signaux sexuels (exemple les signaux colorés, Taff et Freeman-Gallant, 2014) ; d'un autre, du fait que cette hormone ait des propriétés immunosuppressives, seuls les meilleurs mâles sont capables de développer des signaux sexuels attractifs tout en résistant, ou tolérant, les attaques de parasites et/ou de pathogènes. Par ailleurs, la testostérone peut générer des coûts en termes de stress oxydatif (Alonso-Alvarez et al., 2007). Le stress oxydatif est habituellement observé lorsque le taux des espèces réactives de l'oxygène (ROS) altère les défenses antioxydantes. La testostérone est connue pour augmenter le métabolisme de base et donc augmenter la production de ROS (Buchanan et al., 2001 ; Oppliger et al., 2004). Cependant, l'étude de Blas et al., (2006) argumente le fait que les effets des caroténoïdes et de la testostérone sur les fonctions d'ornementation et immunitaires doivent être étudiés ensemble et en interaction. En effet, ces auteurs ont montré qu'une supplémentation en testostérone augmentait la biodisponibilité en caroténoïdes dans le plasma responsable du signal coloré chez la perdrix rouge (*Alectoris rufa*). De ce fait, l'effet immunosuppresseur de la testostérone pourrait être tamponné par la capacité des caroténoïdes à stimuler le système immunitaire.

Chez la rainette arboricole européenne (*Hyla arborea*), les femelles choisissent leur partenaire en partie sur la base des signaux colorés émis par le mâle (Gomez et al., 2009). En effet, à qualité de chant égale, la femelle préfère un mâle présentant un sac vocal à la fois plus rouge et plus foncé (Gomez et al., 2009, 2010). Il a également été montré que le sac vocal de cette espèce contenait plusieurs composés, dont trois caroténoïdes (Richardson et al., 2009). Cependant, cette étude présente des résultats incomplets et des analyses complémentaires sont nécessaires pour approfondir la détermination des composés présents, d'autant plus que la colonne utilisée alors (C18) n'était pas la plus performante pour séparer l'ensemble des caroténoïdes ; une colonne en C30 étant plus appropriée (Li et al., 2007).

Une récente étude a permis de mettre en évidence que le signal sexuel visuel chez cette espèce est testostérone-dépendant (Desprat et al., 2015). Dans cette même étude, où les mâles recevaient une alimentation ne contenant aucun caroténoïde, ceux supplémentés en testostérone ont maintenu la couleur de leur sac vocal foncé alors que la couleur du sac vocal des mâles contrôles s'est éclaircie au cours du temps. Deux hypothèses pourraient expliquer un tel résultat : soit la testostérone permet la réallocation des caroténoïdes stockés probablement dans le foie vers le sac vocal, soit la testostérone empêche la dégradation des caroténoïdes du sac vocal au cours du temps.

Le but de cette étude est, dans un premier temps, d'identifier et de quantifier les caroténoïdes présents dans les 3 compartiments physiologiques d'intérêt, à savoir : le foie pour les formes de stockages, le plasma pour les formes circulantes et le sac vocal pour la

fonction d'ornementation. Dans un second temps, nous avons mesuré les flux de caroténoïdes entre les différents compartiments afin de tester les hypothèses déjà évoquées.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODE**

Nous avons déjà mené une expérience axée sur la relation entre la testostérone, la signalisation et l'immunité sexuelle sur 96 *H. arborea* mâles matures (Desprat et al., 2015). Afin de réduire l'impact de nos expérimentations sur la population de rainette arboricole testée et en conformité avec le protocole d'éthique BH2012-15, les 40 mâles utilisés dans cette étude sont un sous-échantillonnage aléatoire de l'étude précédente.

### **Capture et condition de stabulation**

Les 40 rainettes mâles (*H. arborea*) ont été capturées à la main dans les nuits du 13 avril au 19 avril 2013 dans l'étang Riquet de la fondation Vérots à Monthieux (45°56'33.34''N, 4°55'1.96''E) près de Lyon. Chaque mâle a été identifié et installé dans un terrarium (25 × 17 × 15 cm) muni d'une bassine d'eau, d'une branche et de quatre alvéoles de boîte d'œuf placées dans une salle de stabulation de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne (animalerie humide EcoAquatron agréée par la DSV). En plus de l'éclairage naturel de la pièce, les terrariums ont été éclairés 12 heures par jour (de 7h à 19h) avec des néons à UVB (Exo Terra-Neon repti Glo 5.0, 40 Watts, 30% UVA, 5% UVB, Hagen France, Comb la Ville). Les amphibiens étant ectothermes, des lampes diurnes à infrarouges (Exo Terra, 75 Watts, efficacité thermique : 93%, rayonnement : 65°, Hagen France, Comb la Ville) ont été allumées de 14 h à 16 h. Au cours de l'expérimentation, les individus ont été nourris tous les deux jours avec un grillon (*Acheta domesticus*) ne contenant pas de caroténoïdes (Bellvert F. *com. pers.*).

### **Protocole expérimental**

Une période d'acclimatation de 24 h a été mise en place après la capture pour l'ensemble des individus. Les individus sont répartis aléatoirement en 2 groupes : C-males (mâles contrôles, N = 24), et T-males (mâles supplémentés en testostérone, N = 16). La testostérone a été administrée par voie transdermique à chaque grenouille suivant la méthode utilisée par Desprat et al. (2015). En bref, la testostérone (numéro 86500, FLUKA analytique, Sigma-Aldrich) a été diluée dans de l'huile commerciale de sésame pour obtenir une concentration de 3 mg/ml d'hormone. Les T-males ont reçu 4,5 µl de solution d'hormone sur le dos tous les jours de l'expérimentation, tandis que C-males ont reçu une quantité identique d'huile de sésame pure. Le premier jour de l'expérience (J0), 8 mâles ont été sélectionnés

aléatoirement parmi les C-males. Ils ont été pesés et la couleur de leur sac vocal a été mesurée. Un échantillon de salive a été prélevé pour estimer les niveaux de testostérone. À la suite de ces mesures, les individus ont été euthanasiés afin d'effectuer les différents prélèvements de tissus. Les mêmes mesures ont été refaites à dix jours (D10) sur 8 C-males et 8 T-males et à vingt jours (D20) sur 8 C-males et 8 T-males. Chaque individu a été tué par décérébration avec une aiguille.

### **Analyse hormonale**

Un échantillon de salive a été obtenu avec une boule de coton, préalablement pesée, directement introduite dans la bouche de la grenouille pendant 20 secondes. La salive a été extraite à partir du coton par centrifugation (10 000 rpm pendant 10 min) après addition de 120 µl d'un tampon de phosphate (une solution de phosphate 1 M contenant 1% de SAB, le chlorure de sodium 4 M, 10 mM d'EDTA et 0,1% d'acide de sodium). La mesure de la teneur en testostérone a été réalisée par une mesure immuno-enzymatique déjà validée sur cette espèce (Cayman Chemical®, ref. 582 701) (Desprat et al., 2015).

### **Mesure de la couleur**

La coloration du sac vocal de chaque mâle a été mesurée au repos, à l'aide d'un crayon optique relié à un spectrophotomètre (JAZ-Ocean Optics Inc.). La fibre du crayon optique émet une lumière blanche au xénon contre une surface et les photons non absorbés par cette surface sont comptés et analysés entre 300 nm et 700 nm et comparés à un blanc de synthèse. Dans les faits, le spectrophotomètre effectue des prises de mesures toutes les 10 ms, et fait la moyenne sur 5 mesures. Les spectres ainsi obtenus sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Avicol® (Gomez, 2006) afin d'extraire les données caractéristiques de la couleur du sac vocal des rainettes, telles que la clarté et le chroma. La clarté se mesure en comparant le nombre de photons captés en 150 ms par rapport au nombre de photon émis par le blanc en 150 ms. Le chroma est un paramètre de saturation de la couleur qui est sans unité.

### **Prélèvement des organes et extraction des caroténoïdes**

Le sang est prélevé le plus rapidement possible par insertion d'un capillaire chirurgical directement dans le cœur, puis centrifugé à 10 000 rpm à 4°C pour récupérer 50 µl de surnageant correspondant au plasma. Le sac vocal de chaque mâle est découpé en longeant le bord de la mâchoire inférieure et jusqu'à la limite de coloration au niveau du plastron. Les lobes du foie de chaque individu sont prélevés dans des tubes séparés. Les différents

prélèvements sont pesés pour obtenir la masse fraîche puis plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction.

Le foie et le sac vocal sont lyophilisés pendant 48 h et réduit en poudre (broyeur à bille pendant 1 min à une vitesse de 30 Hz). Le plasma est directement extrait. L'extraction se fait dans la glace et en condition lumineuse réduite pour limiter la dégradation des caroténoïdes. Aux broyats de foie et de sac vocal sont ajoutés 500 µl d'éthanol pur, puis le mélange subit une sonisation de 5 min et une centrifugation pendant 10 min à 15000 rpm. En ce qui concerne l'échantillon de plasma, 400 µl d'éthanol (100%) et 200 µl d'éther diéthylique sont additionnés au 50 µl de plasma avant que le mélange ne subisse une sonisation de 5 min puis soit centrifugé (10 min à 15000 rpm). Le protocole d'extraction des caroténoïdes est ensuite le même quelle que soit la nature de l'échantillon. Le surnageant est récupéré dans un tube opaque et conservé dans la glace. L'opération est répétée une fois sur le culot. Les surnageants des deux étapes sont mélangés dans le même tube puis subissent une sonisation pendant 5 min et sont centrifugés 10 min à 15000 rpm. À la suite de cette dernière centrifugation, le surnageant est prélevé dans un nouveau tube propre et taré à 0,0001 g près avec une balance électronique (AG204 Delta Range, Mettler Toledo, Suisse) puis concentré à sec pendant 2 h à froid dans un évaporateur rotatif type speedvac. Les échantillons récupérés et pesés avec la même balance peuvent être stockés à -80°C en attendant l'analyse. Le jour de l'analyse, les échantillons sont dilués à concentration de 10 mg/ml avec une solution de MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O (84/14/4, v/v/v) puis le mélange subit une sonisation de 5 min et une centrifugation pendant 10 min à 15000 rpm. Le surnageant est récupéré et conservé dans la glace pour l'analyse par chromatographie.

### **Méthodes analytiques**

Les caroténoïdes présents dans les 3 compartiments (le foie, le sac vocal et le plasma) ont été quantifiés et identifiés par ultrachromatographie liquide à haute performance (UHPLC) couplée à de la spectrométrie de masse à ionisation chimique à pression atmosphérique (ACPI-MS). Pour chaque échantillon, 20 µl sont injectés dans l'UHPLC série 1290 Infinity (Agilent technologies, Santa Clara, Californie, USA) contenant un module de pompe, un module d'échantillonnage et un module de séparation au spectre UV. Le système d'élution utilise une phase mobile constituée de deux solvants. Le solvant A (MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O ; 84/14/4, v/v/v) et le solvant B (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La précipitation de la phase mobile se fait sur 50 min à un débit de 1 ml/min selon le gradient présenté dans le tableau 1. Les caroténoïdes sont séparés sur une colonne YMC Carotenoid RP30 (5 µm ; 250 × 4.6 mm, Agilent technologies) maintenue à 25°C. Les caroténoïdes sont détectés à 450 nm par le

détecteur à UV. Les spectres de masse des caroténoïdes contenus dans les résidus d'évaporation des fractions recueillies en UHPLC sont obtenus après ionisation en mode positif (température de gaz de 300°C ; débit 6 L/min, 40 psig, tension capillaire 2500 Volt, et le fragmenteur réglé à 70 Volt). L'appareil utilisé est un spectromètre Agilent technologies, 6530 Accurate-Mass Q-TOF.

Un échantillon témoin ne contenant pas de caroténoïdes (800 µl éthanol + 400 µl d'éther diéthylique) a suivi le même processus d'analyse et a été soustrait à l'ensemble des intensités mesurées sur les échantillons de foie, de sac vocal et de plasma. De plus, 3 contrôles qualité ont été réalisés à partir de 5 µl de tous les échantillons d'un même compartiment. Leur analyse a permis de vérifier que le calibrage de l'UHPLC ne varie pas au cours du temps (temps de rétention et intensité des pics). L'identification des caroténoïdes est effectuée sur les contrôles qualités des 3 compartiments en comparaison avec des spectres déjà publiés (Hsu et al., 2012).

Tableau 1 : gradient d'élution de la phase mobile au cours du temps en pourcentage du solvant B.

| temps (min) | % solvant B |
|-------------|-------------|
| 0           | 0           |
| 4           | 10          |
| 12          | 18          |
| 17          | 21          |
| 20          | 30          |
| 25          | 30          |
| 28          | 39          |
| 40          | 60          |
| 45          | 0           |
| 50          | 0           |

### Statistiques

Les chromatogrammes UV de tous les échantillons sont récupérés et l'aire sous la courbe de tous les pics est intégrée par le logiciel Mass-Hunter Quantitative Analysis B.05.00 (Agilent Technologies). Les temps de rétention de chaque pic des chromatogrammes sont alignés. Les intensités des pics, relatives à la masse de l'échantillon avant l'extraction pour le foie et le sac vocal, sont compilées dans une matrice (40 échantillons de chaque compartiment, foie, sac vocal et plasma et 13 composants) de manière à effectuer des analyses en composante principale (ACP) entre les compartiments et les différents traitements. La quantité relative de chaque type de caroténoïdes a été calculée en comparant leurs proportions relatives, comme en témoignent les surfaces de pic UHPLC, à la teneur totale en caroténoïdes déterminée par spectrophotométrie. Elle est exprimée en Unité Arbitraire (UA).

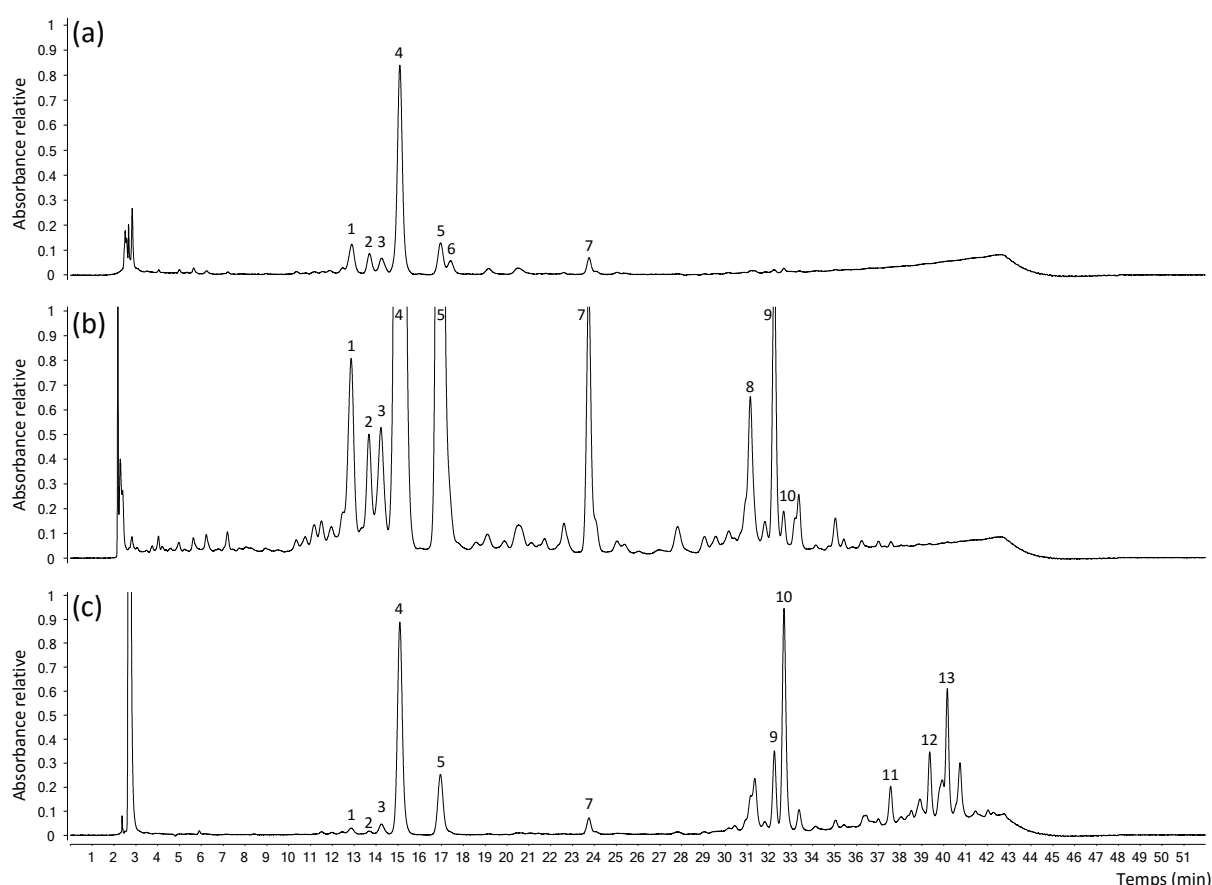
Les relations entre les concentrations des différents caroténoïdes dans le sac vocal et la couleur de celui-ci sont analysées par corrélation de Pearson. Les différences de concentration de caroténoïdes pour chaque compartiment entre les traitements sont analysées par ANOVA 2 avec le jour (2 modalités, J10 et J20) et le traitement (2 modalités, C-male et T-male) en variables explicatives après avoir vérifié la normalité de chaque groupe et l'égalité des variances.

Les analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel de statistique R.3.2.1 2013.

## RÉSULTATS

### Profils des caroténoïdes dans les différents tissus

Au total, 53 composés ont été détectés dans nos échantillons, dont 20 composés sont spécifiques d'un compartiment : 5 sont spécifiques du plasma, 7 spécifiques du foie, et 12 spécifiques du sac vocal (les plus apolaires). Au total, le plasma compte 25 composés, le foie 36 et le sac vocal présente la plus grande diversité avec 41 composés dénombrés (Figure 1).



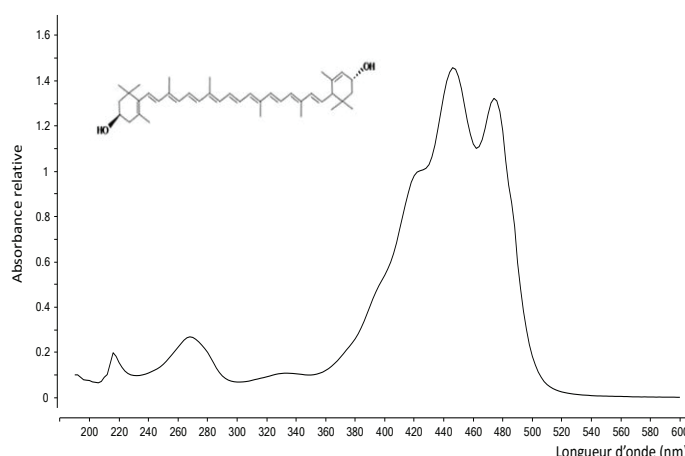
**Figure 1 : Chromatogrammes à 450 nm** effectués sur les contrôles qualité du plasma (a) du foie (b) et du sac vocal (c). La présence de caroténoïde identifié dans chaque compartiment physiologique est notifiée par le numéro du caroténoïde dont la correspondance est affichée dans le tableau 2.

Parmi les 53 composés biochimiques enregistrés, 13 ont été identifiés comme étant des caroténoïdes car leur spectre UV présente la structure caractéristique des caroténoïdes (3



longueurs d'onde maximale, voir exemple Figure 2). Parmi ces caroténoïdes, 7 ont été identifiés par comparaison de leur masse à la littérature (Cf. tableau 2).

**Figure 2 : Spectrogramme UV de la all-*trans*-lutéine**, caroténoïde majoritaire dans le foie, le sac vocal et le plasma chez les mâles *H. arborea* et sa configuration chimique. Le spectre UV des caroténoïdes est caractéristique par 3 pics, dans cet exemple : à 422 nm, 446 nm et 474 nm.



**Tableau 2 : Identification des caroténoïdes présents dans le foie, le plasma et le sac vocal.** TR : temps de rétention ; lambda max : longueur d'onde maximale d'absorption, m/z : rapport masse/charge ; ND : non déterminé.

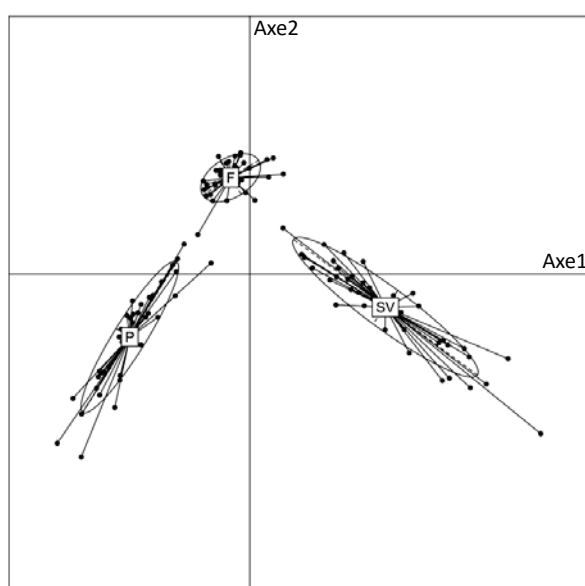
| N° | TR<br>(min) | λ max (nm)          | m/z                 | nom                                | site         |      |        |
|----|-------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|--------------|------|--------|
|    |             |                     |                     |                                    | sac<br>vocal | foie | plasma |
| 1  | 12.86       | 332, 417, 440, 467, | 551.4233 [M + H-18] | <i>cis</i> -lutein                 | x            | x    | x      |
| 2  | 13.67       | 332, 417, 440, 467, | 551.4299 [M + H-18] | <i>cis</i> -lutein                 | x            | x    | x      |
| 3  | 14.22       | 425, 450, 467,      | 567.4177 [M + H]    | ND                                 | x            | x    | x      |
| 4  | 15.07       | 422, 446, 474,      | 569.4341 [M + H]    | All- <i>trans</i> -lutein          | x            | x    | x      |
| 5  | 16.93       | 430, 453, 480,      | 569.4339 [M + H]    | All- <i>trans</i> -zeaxanthin      | x            | x    | x      |
| 6  | 17.40       | 420, 440, 472,      | 551.424 [M + H-18]  | 9 ou 9'- <i>cis</i> -lutein        |              |      | x      |
| 7  | 23.74       | 428, 454, 480,      | 553.439 [M + H]     | All- <i>trans</i> -B-cryptoxanthin | x            | x    | x      |
| 8  | 31.15       | 432, 457, 485,      | 537.4467 [M + H]    | All- <i>trans</i> -B-carotene      |              | x    |        |
| 9  | 32.24       | 270, 425, 450, 477, | 551.4237 [M + H]    | ND                                 | x            | x    |        |
| 10 | 32.68       | 425, 450, 477,      | ND                  | ND                                 | x            | x    |        |
| 11 | 37.56       | 430, 457, 483,      | ND                  | ND                                 | x            |      |        |
| 12 | 39.36       | 425, 457, 483,      | ND                  | ND                                 | x            |      |        |
| 13 | 40.16       | 427, 455, 483,      | ND                  | ND                                 | x            |      |        |

Note : les caroténoïdes sont les seuls métabolites connus pour être plus sensible aux UV qu'à la masse. C'est pourquoi certains composés ont pu être identifiés comme appartenant à la famille des caroténoïdes sans connaître leur masse.

Six caroténoïdes sont communs aux trois compartiments physiologiques, ils font partis des caroténoïdes les plus polaires (avec un temps de rétention plus court). La lutéine, sous sa forme all-*trans*-lutéine est le caroténoïde majoritairement présent dans les trois tissus (Figure 1 composé 4, Figure 2). Il représente 66.3%, 64.6% et 56.7%, des caroténoïdes présents dans le foie, le plasma et le sac vocal respectivement. Les caroténoïdes spécifiques des compartiments représentent une faible proportion de la quantité totale en caroténoïdes : 1.4% pour le all-*trans*-β-carotène dans le foie, 2.5% pour la 9 ou 9'-*cis*-lutein dans le plasma, et 2.0% pour les caroténoïdes 12 et 13 dans le sac vocal. Malgré ces faibles proportions, la

composition en caroténoïdes permet de discriminer les trois compartiments étudiés à l'aide d'une analyse en composante principale (Figure 3).

D'un point de vue quantitatif, la teneur relative en caroténoïdes trouvée dans le foie est significativement plus importante que celle trouvée dans le sac vocal (Student,  $t = -4.32$ , ddl = 39,  $P < 10^{-3}$ , moyenne  $\pm$  écart type,  $56186 \pm 7531$  Unité Arbitraire (UA) de caroténoïdes/mg de foie et  $4771 \pm 1623$  UA caroténoïdes/mg de sac vocal) et dans le plasma (Student,  $t = -4.63$ , ddl = 39,  $P < 10^{-4}$ ,  $1057 \pm 885$  UA caroténoïdes/ $\mu$ l). La quantité relative totale de caroténoïdes dans le foie est 12 fois supérieure à celle du sac vocal et 53 fois supérieure à celle du plasma. En revanche, il n'y a pas de corrélation entre la quantité relative de caroténoïdes observée dans le foie et celles du sac vocal ou du plasma (toutes les  $P > 0.05$ ).

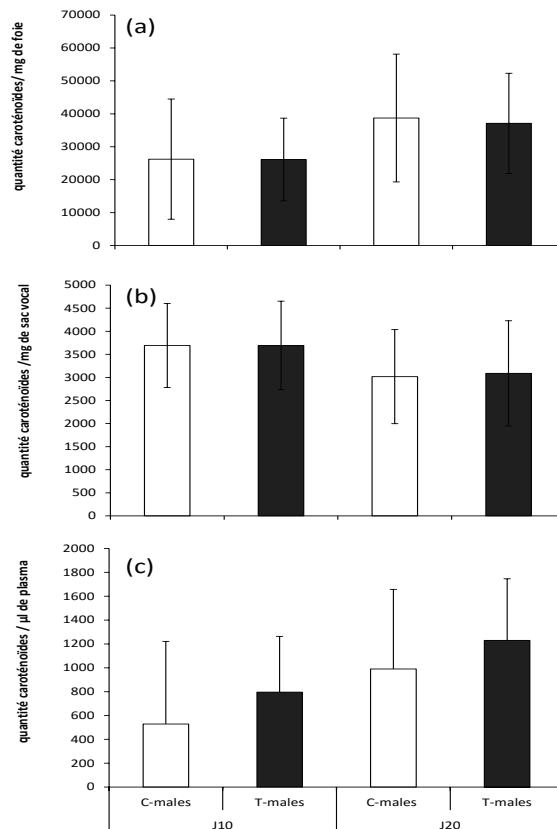


**Figure 3 : Analyse en composante principale (ACP) des 3 compartiments physiologiques** sur 2 axes principaux permettant d'expliquer 61.6% de la variabilité. L'axe 1 porte 41.1% de la variabilité et l'axe 2 20.5%. L'ACP permet de discriminer le foie (F), le sac vocal (SV) et le plasma (P), à partir de leur composition biochimique en caroténoïdes en pourcentage. Chaque point par compartiment physiologique représente un individu.

### Effet de la testostérone sur les teneurs en des caroténoïdes

La quantité relative de caroténoïdes mesurée dans le foie ne varie ni entre les traitements ni au cours du temps (ANOVA,  $F = 1.34$  ; ddl = 29, 3 ;  $P = 0.28$ , Figure 4A). D'autre part, dans le sac vocal, il n'y a pas de différence significative entre les groupes (ANOVA,  $F = 0.68$ , ddl = 31, 3 ;  $P = 0.57$ , Figure 4B).

Tous traitements confondus, une augmentation de la quantité relative de caroténoïdes dans le plasma est observée entre J10 et J20 (lm, jour,  $F = 4.75$  ; ddl = 1 ;  $P = 0.03$  ;  $810 \pm 697$  et  $1445 \pm 966$  UA à J10 et J20 respectivement, Figure 4C). En revanche, dans ce compartiment physiologique, il n'y a pas de différence significative entre les individus supplémentés en testostérone et les contrôles (lm, traitement,  $F = 0.08$  ; ddl = 1 ;  $P = 0.77$ , Figure 4C).

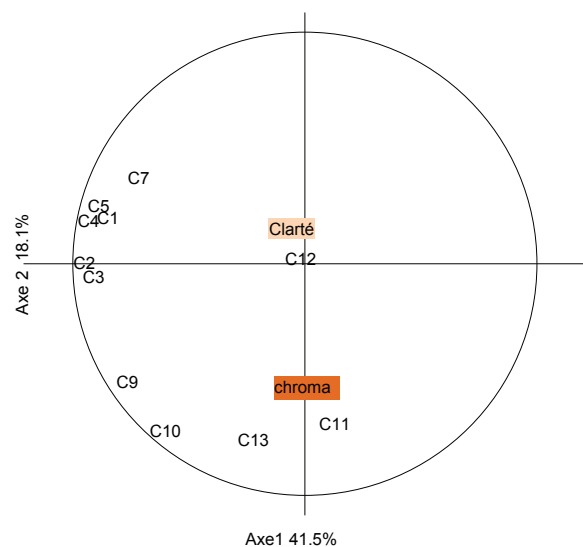


**Figure 4 : Moyenne  $\pm$  sd de la quantité relative de caroténoïdes (a) dans le foie, (b) dans le sac vocal et (c) dans le plasma à J10 et J20 pour les individus contrôles (C-males, en blanc) et supplémentés en testostérone (T-males, en noir), N = 40. Les quantités de caroténoïdes sont exprimées en unité arbitraire par masse sèche de tissus ou par  $\mu$ l de plasma.**

### Couleur et caroténoïdes

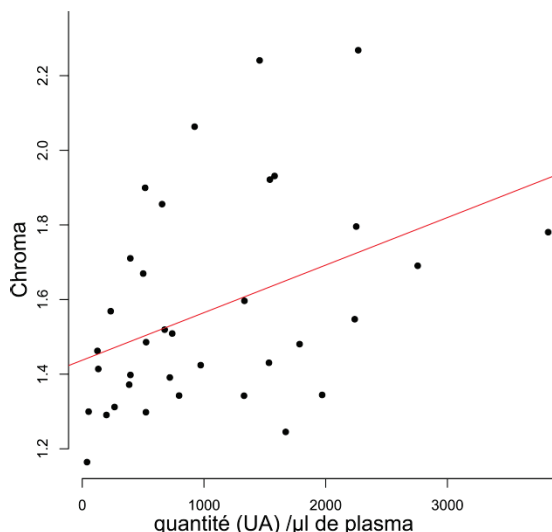
Contrairement aux résultats de Desprat et al. (2015), nous n'observons pas d'effet significatif de la testostérone sur la couleur du sac vocal, probablement en raison de la petite taille du groupe échantillonné (ANOVA, ddl = 29,3 ;  $F = 1.63$ ,  $P = 0.20$  et  $F = 2.07$ ,  $P = 0.13$  pour le chroma et la clarté du sac vocal respectivement). Cependant, d'après l'ACP réalisée sur les 11 caroténoïdes identifiés dans le sac vocal (Figure 5), les caroténoïdes les plus apolaires (composés 11, 12 et 13) spécifiques du sac vocal sont les plus proches de l'axe expliqué par la couleur.

**Figure 5 : Analyse en composante principale (ACP) des caroténoïdes présents dans le sac vocal et les paramètres de couleur sur 2 axes principaux permettant d'expliquer 59.6% de la variabilité. L'axe 1 porte 41.5% de la variabilité et l'axe 2 18.1%. L'ACP permet d'associer l'axe 1 au gradient de couleur des sacs vocaux des individus, des plus clairs aux plus saturés en couleur. Les variables présentées sont les 11 différents caroténoïdes identifiés dans le sac vocal.**



Statistiquement, nous n'observons pas

de corrélation entre les différents caroténoïdes du sac vocal et couleur (Pearson, toutes les  $P > 0.05$ ). En revanche, il existe un lien entre la quantité de caroténoïdes présents dans le plasma et la saturation en couleur du sac vocal (le chroma) mesurée sur le mâle avant son euthanasie (Pearson,  $P = 0.01$ , ddl = 33,  $r^2 = 0.17$ , Figure 6).



**Figure 6 : Régression linéaire entre la quantité relative (UA) de caroténoïdes par µl de plasma et le chroma, paramètre de couleur du sac vocal. Équation de la droite :  $2.10^{-4}x + 1.43$ ,  $N = 35$ .**

## DISCUSSION

### Identification des caroténoïdes dans le foie, le plasma et le sac vocal

L'utilisation d'un UHPLC-DAD permet de séparer efficacement les différents isomères de caroténoïdes en employant une colonne en phase réverse C30 et un gradient de phase mobile. Au total, nous avons identifié 13 caroténoïdes. Parmi eux, 6 sont communs aux trois comportements physiologiques et comptent parmi les plus polaires et les plus abondants. Leur structure biochimique pourrait leur permettre de passer les barrières des membranes afin de circuler librement entre les compartiments. L'identification des caroténoïdes présents dans chaque compartiment physiologique a aussi permis de mettre en évidence une spécificité de la composition en caroténoïdes pour le foie, le sac vocal et le plasma.

Dans le foie, la quantité totale de caroténoïdes est 8,4 fois supérieure à celle du sac vocal. En accord avec des études sur les oiseaux (McGraw et al., 2006b ; Isaksson et Andersson, 2008), ce résultat nous permet d'appuyer l'hypothèse selon laquelle le foie serait l'organe de stockage des caroténoïdes dans l'organisme. Parmi les 9 caroténoïdes identifiés dans le foie, le *all-trans*- $\beta$ -carotène est spécifique du foie. D'après la revue de Sthal et Sies (2005), une attention particulière a été accordée aux effets stimulateurs exercés par les carotènes sur les jonctions communicantes (GJC) entre les cellules. Les GJC sont des pores remplis d'eau connectant le cytosol de deux cellules voisines et permettant l'échange de composés à faible masse moléculaire. Parmi les caroténoïdes, le  $\beta$ -carotène est un stimulateur

efficace des GJC. En culture cellulaire, les caroténoïdes inhibent de manière réversible la progression des fibroblastes. Cet effet inhibiteur est lié à une augmentation de GJC induite par ces composés. Les GJC sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Sthal et al., 1997). Le fait que les carotènes soient impliqués dans la régulation de fonctions cellulaires permettant ou pas la croissance d'un épithélium pourrait expliquer pourquoi les carotènes identifiés dans notre étude ne se retrouvent pas dans le plasma. La régulation des GJC est complexe et les mécanismes liés à l'activité des caroténoïdes ne sont pas encore pleinement compris (Sthal et Sies, 2005).

Dans le plasma, les 7 caroténoïdes identifiés sont parmi les plus polaires. Le 9 ou 9'-*cis*-lutéine appartenant aux xanthophylles est spécifique du plasma. La lutéine est connue pour son rôle dans le fonctionnement des photorécepteurs au niveau de la rétine chez l'homme (Hammond, 2008) mais une étude plus ancienne avait déjà démontré ce rôle en utilisant des yeux de grenouille intacts (*Rana pipiens*, Bernstein et al., 1998). Pour pouvoir agir au niveau des yeux, la lutéine ingérée et assimilée doit être transportée par le plasma. Ce transport se fait à l'aide des lipoprotéines (McGraw et al., 2006a ; Connor et al., 2007). La faible variabilité des caroténoïdes présents dans le plasma pourrait s'expliquer par le fait que seules certaines structures biochimiques pourraient être transportées par les lipoprotéines. En outre, les propriétés antioxydantes des caroténoïdes oxygénés, tels que la lutéine, ont été très étudiées (Peronne et al., 2010 ; Du et al., 2015 ; Fatani et al., 2015). Aussi, les caroténoïdes plasmatiques sont aussi connus pour stimuler la production de cellules du système immunitaire (Martin et al., 2000). Étant donné leur composition moléculaire spécifique conjuguée à leur structure à doubles liaisons, les caroténoïdes comme la lutéine peuvent servir comme capteurs efficaces des électrons non appariés nocifs (exemple, les oxygènes singulets, les radicaux libres) produits par les processus normaux du métabolisme et qui endommagent les tissus (exemple par peroxydation des lipides, Krinsky, 1992).

La plus grande diversité de caroténoïdes se trouve dans le sac vocal. Parmi eux, les plus apolaires sont spécifiques de cet organe portant le signal visuel. L'ACP réalisée suggère un rôle plus important de ces caroténoïdes pour expliquer une partie la couleur du sac vocal d'un point de vue qualitatif. En 2009, Richardson et al. avaient déjà identifié 3 caroténoïdes dans les tissus du sac vocal des mâles *H. arborea*. Nos résultats confirment ces premiers résultats et les techniques utilisées dans notre étude ont permis d'identifier 9 autres caroténoïdes dans l'organe portant le signal sexuel visuel. En revanche, nos résultats montrent une corrélation positive entre la quantité de caroténoïdes présente dans le plasma et la saturation en couleur (le chroma) du sac vocal. Ce résultat nous conforte dans l'idée que la couleur du sac vocal est caroténoïde-dépendant, même si le lien entre le plasma et le sac vocal

n'est pas clairement établi. D'après Blas et al. (2006), parmi les caroténoïdes circulants dans le plasma, une partie de la fraction non utilisée pour la fonction immunitaire pourrait être allouée à la fonction d'ornementation.

### **Effet de la testostérone sur la biodisponibilité des caroténoïdes.**

Dans notre étude expérimentale, nous avons essayé de comprendre le rôle de la testostérone dans la variation de la couleur observée dans l'étude de Desprat et al. (2015). En effet, les individus supplémentés en testostérone avaient un sac vocal qui ne s'éclaircissait pas autant que celui des individus contrôles, alors que l'alimentation était dépourvue de caroténoïdes. Deux mécanismes non-exclusifs avaient été avancés pour expliquer ce résultat : 1) la testostérone empêche la dégradation des caroténoïdes dans le sac vocal et/ou 2) elle favorise la redistribution des caroténoïdes entre le foie et le sac vocal *via* le plasma (Blas et al., 2006).

D'après nos résultats, les variations de la quantité de caroténoïdes du foie, du sac vocal et du plasma ne sont pas expliquées par l'effet de la supplémentation en testostérone chez les mâles. Ces résultats ne permettent pas de valider l'hypothèse selon laquelle la testostérone augmente la quantité de caroténoïdes circulants dans le plasma. Contrairement aux études précédentes, la couleur du sac vocal chez nos individus ne varie pas en fonction de la testostérone. Et puisque la couleur du sac vocal est liée à la quantité de caroténoïdes dans le sac vocal, ce résultat peut expliquer le fait que nous n'observions pas non plus d'effet du traitement à la testostérone sur la quantité de caroténoïdes dans le sac vocal. Ces résultats sont probablement dus au manque de puissance du test lié à un faible échantillonnage alors que nous sommes exactement dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude de Desprat et al. (2015) à partir de laquelle les individus ont été prélevés.

Cependant, les variations de caroténoïdes dans le sac vocal et le plasma peuvent en partie s'expliquer par l'effet temps. Bien que non significative, nous observons une diminution de la quantité de caroténoïdes dans le sac vocal entre J10 et J20 au profit de la quantité de caroténoïdes dans le plasma dans ce même laps de temps quel que soit le traitement. En condition expérimentale, dans un laboratoire et sans apport de caroténoïdes *via* l'alimentation, nos résultats suggèrent que les caroténoïdes du sac vocal seraient réalloués dans le plasma. Blas et al. (2006) suggèrent que ce mécanisme de réallocation des caroténoïdes entre les compartiments physiologiques soit modulé par la testostérone - de par son action sur la régulation des lipoprotéines chargées du transport des caroténoïdes dans le plasma (McGraw et al., 2006a). Ainsi, l'augmentation des caroténoïdes dans le plasma permettrait de tamponner l'effet immunosuppresseur de la testostérone. Cependant, compte

tenu de la grande quantité de caroténoïdes stockée dans le foie, il paraît peu probable que l'augmentation de la quantité de caroténoïdes dans le plasma soit expliquée par une diminution de la quantité de caroténoïdes dans le sac vocal, puisque les caroténoïdes fixés dans le tégument du sac vocal ne sont pas les caroténoïdes les plus accessibles pour une réallocation rapide et efficace. Par contre, nous pensons qu'il est plus probable que la diminution de la couleur du sac vocal soit expliquée par une dégradation des caroténoïdes dans le tégument. En effet, les caroténoïdes sont des molécules plutôt fragiles et sujettes à des mécanismes de dégradation (exemple : la température, la lumière).

Pour conclure, nos résultats ont mis en évidence la relation directe qui existe entre la quantité de caroténoïdes dans le plasma et la couleur du sac vocal. Le signal sexuel visuel chez les mâles *H. arborea* est donc caroténoïde-dépendant. Cette relation suggère un rôle des caroténoïdes dans l'honnêteté du signal, de par la dualité de leur allocation pour la fonction immunitaire ou la fonction ornementale. En revanche, nos résultats ne nous permettent pas d'expliquer le mécanisme sous-jacent de la variation de la couleur du sac vocal chez les individus supplémentés en testostérone dans l'étude de Desprat et al. (2015). En effet, nous n'observons pas d'effet de la testostérone sur la variation de la quantité de caroténoïdes entre le foie, le plasma et le sac vocal.

## REFERENCES

- Alonso-Alvarez, C., S. Bertrand, G. Devevey, M. Gaillard, J. Prost, B. Faivre, and G. Sorci. 2004a. An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *American Naturalist* **164** : 651-659.
- Alonso-Alvarez, C., S. Bertrand, G. Devevey, J. Prost, B. Faivre, and G. Sorci. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* **7** : 363-368.
- Alonso-Alvarez, C., S. Bertrand, B. Faivre, O. Chastel, and G. Sorci. 2007. Testosterone and oxidative stress : The oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **274** : 819-825.
- Baeta, R., B. Faivre, S. Motreuil, M. Gaillard, and J. Moreau. 2008. Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display : an experimental study in the blackbird (*Turdus merula*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **275** : 427-434.
- Barry, K. L., T. E. White, D. N. Rathnayake, S. A. Fabricant, and M. E. Herberstein. 2015. Sexual signals for the colour-blind : Cryptic female mantids signal quality through brightness. *Functional Ecology* **29** : 531-539.



- Blas, J., L. Perez-Rodriguez, G. R. Bortolotti, J. Vinuela, and T. A. Marchant. 2006. Testosterone increases bioavailability of carotenoids : Insights into the honesty of sexual signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** : 18633-18637.
- Buchanan, K. L., M. R. Evans, A. R. Goldsmith, D. M. Bryant, and L. V. Rowe. 2001. Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows : a new cost of dominance signalling ? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **268** : 1337-1344.
- Chew, B. P. and J. S. Park. 2004. Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition* **134** : 257S-261S.
- Connor, W. E., P. B. Duell, R. Kean, and Y. Wang. 2007. The prime role of HDL to transport lutein into the retina : Evidence from HDL-Deficient WHAM chicks having a mutant ABCA1 transporter. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **48** : 4226-4231.
- Desprat, J.L., T. Lengagne, A. Dumet, E. Desouhant, and N. Mondy. 2015. Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog : Trade-off between sexual signals and immunity ? *Behavioral Ecology* **26** : 1138-1146.
- Du, S.-Y., Y.-L. Zhang, R.-X. Bai, Z.-L. Ai, B.-S. Xie, and H.-Y. Yang. 2015. Lutein prevents alcohol-induced liver disease in rats by modulating oxidative stress and inflammation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* **8** : 8785-8793.
- Fatani, A. J., S. S. Al-Rejaie, H. M. Abuhashish, A. Al-Assaf, M. Y. Parmar, and M. M. Ahmed. 2015. Lutein dietary supplementation attenuates streptozotocin-induced testicular damage and oxidative stress in diabetic rats. *Bmc Complementary and Alternative Medicine* **15**. doi : 10.1186/s12906-015-0693-5
- Folstad, I. and A. J. Karter. 1992. Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *American Naturalist* **139** : 603-622.
- Gomez, D. 2006. AVICOL, a program to analyse spectrometric data. Available from the author upon request at [dodogomez@yahoo.fr](mailto:dodogomez@yahoo.fr).
- Gomez, D., C. Richardson, T. Lengagne, M. Derex, S. Plenet, P. Joly, J. P. Lena, and M. Thery. 2010. Support for a role of colour vision in mate choice in the nocturnal European treefrog (*Hyla arborea*). *Behaviour* **147** : 1753-1768.
- Gomez, D., C. Richardson, T. Lengagne, S. Plenet, P. Joly, J. P. Lena, and M. Thery. 2009. The role of nocturnal vision in mate choice : Females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **276** : 2351-2358.
- Grether, G. F. 2000. Carotenoid limitation and mate preference evolution : A test of the indicator hypothesis in guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution* **54** : 1712-1724.
- Hammond, B. R., Jr. 2008. Possible role for dietary lutein and zeaxanthin in visual development. *Nutrition Reviews* **66** : 695-702.
- Hill, G. E. 1991. Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature* **350** : 337-339.

- Isaksson, C. and S. Andersson. 2008. Oxidative stress does not influence carotenoid mobilization and plumage pigmentation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **275** : 309-314.
- Juola, F. A., K. McGraw, and D. C. Dearborn. 2008. Carotenoids and throat pouch coloration in the great frigatebird (*Fregata minor*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* **149** : 370-377.
- Karubian, J., W. R. Lindsay, H. Schwabl, and M. S. Webster. 2011. Bill coloration, a flexible signal in a tropical passerine bird, is regulated by social environment and androgens. *Animal Behaviour* **81** : 795-800.
- Kodric-Brown, A. and P. F. Nicoletto. 2001. Female choice in the guppy (*Poecilia reticulata*) : the interaction between male color and display. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **50** : 346-351.
- Krinsky, N. I. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **200** : 248-254.
- Li, L., J. Qin, S.-a. Yin, and G. Tang. 2007. Effects of mobile phase ratios on the separation of plant carotenoids by HPLC with a C30 column. *Chromatographia* **65** : 91-94.
- Martin, K. R., D. Wu, and M. Meydani. 2000. The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* **150** : 265-274.
- McGraw, K. J. and D. R. Ardia. 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors : An experimental test. *American Naturalist* **162** : 704-712.
- McGraw, K. J., S. M. Correa, and E. Adkins-Regan. 2006a. Testosterone upregulates lipoprotein status to control sexual attractiveness in a colorful songbird. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60** : 117-122.
- McGraw, K. J., P. M. Nolan, and O. L. Crino. 2006b. Carotenoid accumulation strategies for becoming a colourful House Finch : analyses of plasma and liver pigments in wild moulting birds. *Functional Ecology* **20** : 678-688.
- Olson, V. A. and I. P. F. Owens. 1998. Costly sexual signals : Are carotenoids rare, risky or required ? *Trends in Ecology & Evolution* **13** : 510-514.
- Oppliger, A., M. S. Giorgi, A. Conelli, M. Nembrini, and H. B. John-Alder. 2004. Effect of testosterone on immunocompetence, parasite load, and metabolism in the common wall lizard (*Podarcis muralis*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **82** : 1713-1719.
- Perrone, S., M. Longini, B. Marzocchi, A. Picardi, C. V. Bellieni, F. Proietti, A. Rodriguez, G. Turrisi, and G. Buonocore. 2010. Effects of lutein on oxidative stress in the term newborn : A pilot study. *Neonatology* **97** : 36-40.
- Richardson, C., J. Popovici, F. Bellvert, and T. Lengagne. 2009. Conspicuous colouration of the vocal sac of a nocturnal chorusing treefrog : carotenoid-based ? *Amphibia-Reptilia* **30** : 576-580.

- Stahl, W., S. Nicolai, K. Briviba, M. Hanusch, G. Broszeit, M. Peters, H. D. Martin, and H. Sies. 1997. Biological activities of natural and synthetic carotenoids : Induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* **18** : 89-92.
- Stahl, W. and H. Sies. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1740**:101-107.
- Starnberger, I., D. Preininger, and W. Hödl. 2014. The anuran vocal sac : A tool for multimodal signalling. *Animal Behaviour* **97** : 281-288.
- Taff, C. C. and C. R. Freeman-Gallant. 2014. An experimental test of the testosterone mediated oxidation handicap hypothesis in a wild bird. *Hormones and Behavior* **66** : 276-282.
- Todd, P. A., W. Y. Wang, H. Huang, C. C. Belle, M. L. M. Lim, and D. C. J. Yeo. 2011. The function of colourful facial bands in mangrove crab (*Perisesarma*) communication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **407** : 26-33.
- Velando, A., R. Beamonte-Barrientos, and R. Torres. 2006. Pigment-based skin colour in the blue-footed booby : An honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia* **149** : 535-542.

## **Article 5 : Foraging behavior and testosterone: supplemented males are better hunters**

**Desprat J.L.**, Lengagne T., and Mondy N.

*Animal Behaviour*, soumission prévue novembre 2015.

### **Problématique :**

Chez de nombreuses espèces, le choix des femelles pour leur partenaire sexuel se base sur les signaux sexuels émis par les mâles et qui sont supposés refléter honnêtement leur qualité génétique. L'honnêteté des signaux repose en partie sur le coût associé à la production et au maintien de ces signaux. Le chant des mâles chez les grenouilles est un signal acoustique connu pour être coûteux en terme d'énergie, puisque la contraction rapide et puissante des muscles responsables du chant entraîne une augmentation du métabolisme. D'un autre côté, les signaux visuels, comme la coloration du sac vocal, sont liés à la présence de pigments caroténoïdes qui ne sont pas synthétisables *de novo* par les vertébrés. Par conséquent, les coûts associés à l'expression des signaux sexuels imposent aux mâles de bonnes capacités d'approvisionnement alimentaire pour obtenir de l'énergie mais également des nutriments non-synthétisables nécessaires à la production de signaux de bonne qualité. La testostérone, connue pour améliorer les performances cognitives et musculaires pourrait augmenter les capacités d'approvisionnement des mâles et jouer un rôle indirect dans l'expression des signaux sexuels.

### **Objectifs :**

L'objectif de cette étude est de tester expérimentalement l'effet de la testostérone sur les performances de chasse chez *H. arborea*.

### **Hypothèses :**

- H1 : la testostérone améliore la vigilance des mâles en diminuant le temps de latence avant la première attaque ;
- H2 : la testostérone permet aux mâles d'avoir des attaques plus rapides ;
- H3 : la testostérone augmente le succès d'attaque des mâles.

### **Méthodes :**

Nous avons expérimentalement manipulé le taux de testostérone chez 60 mâles *H. arborea* par application topique de solution avec ou sans testostérone à une concentration de 3mg/ml. Le test comportemental consiste en l'enregistrement d'une session de 10 min où le mâle est placé dans une arène face à un grillon virtuel se déplaçant sur un écran. Le temps de latence, la durée moyenne des attaques et le succès moyen des attaques sont mesurés.

### **Résultats :**

- La testostérone réduit de moitié le temps de latence avant la première attaque.
- L'effet de la testostérone sur la durée moyenne d'une attaque dépend de la masse des individus. Chez les individus témoins, les petits mâles ont une attaque plus rapide que les gros. La supplémentation en testostérone augmente la durée de l'attaque des petits mâles mais pas des plus gros.
- La testostérone n'a pas d'effet sur le succès d'attaque mesuré.

### **Conclusion :**

Nos résultats montrent que la testostérone peut modifier le comportement d'approvisionnement alimentaire chez *H. arborea*. En effet, ils suggèrent que la testostérone améliore la vigilance des mâles à leur environnement par rapport aux individus témoins. D'autre part, la durée de l'attaque dépend de la masse de l'individu. Chez les individus témoins, les petits mâles ont un temps d'attaque plus rapide que les gros, suggérant une motivation à la chasse plus importante probablement liée à la quantité de leurs réserves énergétiques. Chez les individus supplémentés en testostérone, la motivation à chasser est réduite chez les mâles les plus petits par rapport aux individus témoins mais ce résultat ne se retrouve pas chez les plus gros mâles. Chez *H. arborea*, le temps des mâles passé à chanter sur la mare augmente leur succès reproducteur. Il existerait alors un compromis dans l'allocation du temps passé à chanter et la recherche alimentaire. Ce compromis pourrait dépendre de la teneur en testostérone des mâles.

# Foraging behavior and testosterone: supplemented males are better hunters

**Desprat J.L.**, Mondy N. and Lengagne T.

Université de Lyon, UMR 5023 Écologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés,  
Université Lyon 1, ENTPE, CNRS, F - 69622 Villeurbanne, France

Key words: alertness, attack duration, attack success, *Hyla arborea*, sexual selection.

## INTRODUCTION

During the breeding season, females do not choose their mate at random because they differ in their quality. The female mate preferences largely depend of direct and/or indirect benefits obtained. Direct benefits could be defined as the direct contribution from males to female fecundity such as the territory quality or parental care. Indirect benefits are defined as the male's genetic contribution to their offspring (Anderson 1994). In this case a direct assessment of male quality is often impossible. Therefore, females rely on males to honestly advertise their quality as potential mates through honest sexual signals.

An honest signal was first defined by Zahavi in 1977 as a costly signal to produce and maintain in terms of both energy and survival. Signal honesty can be achieved through several main types of signals, such as cost-added signals and index signals (Maynard Smith and Harper 1995). Because the immune system competes for resources with sexually selected ornaments, the mechanism proposed by the immunocompetence handicap hypothesis (ICHH) is another way to consider signal honesty in the mate choice context (Folstad and Karter 1992). Indeed, the mechanism proposed by the ICHH suggests that testosterone has a handicapping effect in males by both promoting the development of sexual signals and suppressing immune function (Folstad and Karter 1992).

It is known that in numerous vertebrate species, females choose their mate on a carotenoid-based coloration of males (Setchell 2005; Karino et al. 2005; Hill and McGraw 2004; Gomez et al. 2009; Cote et al. 2010). Beyond the obvious pigmentary role of carotenoids in the teguments, it has been proved that circulating carotenoids minimize oxidative stress and influence immune system activity (Chew and Park 2004). Since vertebrates cannot synthesize carotenoids *de novo*, they have to find carotenoids *via* their food (Olson and Owens 1998). Ultimately, carotenoid intake limits ornament expression (Karino and Shinjo 2007; Karino et al. 2007). In a pioneer study, Blas et al. (2006) have demonstrated that testosterone increases the bioavailability of the carotenoid pigments in plasma and liver

of red partridge, *Alectoris rufa*. Plasma carotenoids were in turn responsible for individual differences in coloration and immune response.

Female preferences for costly calls (e.g. with high amplitude and elevated speed) and size indicator (e.g. low frequency) could result in a selection of males with high foraging capacity, those able to quickly renew their energetic reserves. In endotherms, metabolic costs have primarily function to regulate and maintaining the body temperature, while in ectotherm such as anuran these costs are reduced. Moreover, the metabolism of the muscles used in calling is the main responsible of the energetic cost of sound production. In anurans, metabolic fuel for muscle contraction during calling activity comes from carbohydrates and lipids that are stored in the trunk muscles and provided by food (Pough et al. 1992; Bevier 1997; Grafe and Thein 2001).

As a consequence, the expression of sexual signal is costly and their expressions are linked to metabolic fuel input but also non synthesizable compound such as pigments for visual signals. Testosterone is known to play an important role in several behaviors such as aggressive behavior (Carré and McCormick 2008), territorial behavior (Mougeot et al. 2005), or foraging behavior (Chavez-Zichinelli et al. 2014). In this last case testosterone can increase cognition capacity (Lacreuse et al. 2012) and muscular performance (Huyghe 2010) which may increase the food intake success.

The European tree frog (*Hyla arborea*) is a lekking species and previous experiments clearly established that females choose their mate based on acoustic signals and vocal sac coloration (Gomez et al. 2009; Richardson and Lengagne, 2010). Moreover, the expressions of both the acoustic and visual sexual signals of *H. arborea* males are testosterone dependent (Desprat et al. 2015): males bearing the more attractive signals are those with the highest testosterone rate. *H. arborea* is an income breeder with alternation between foraging periods outside the pond and calling periods to attract females, probably corresponding to a fasting period of ten days (Field and Klump 2005). The shorter hunting period is, the longer calling period is. In the present study, we experimentally investigated the testosterone effect on the foraging capacity of *H. arborea*. Levels of testosterone due to exogenous supplementation are in the natural range of field hormone levels measured during the breeding season (Desprat et al. 2015). Foraging capacities are experienced on males placed in an arena with a virtual cricket moving on a computer screen. We hypothesized that testosterone may challenge hunting behavior by 1) improving the alertness and reducing the latency of the first attack, 2) decreasing the attack duration, and 3) improving the score success of attacks.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals capture**

Fifty nine sexually mature *H. arborea* males were collected during nightly choruses in mid-April, corresponding to the beginning of the breeding season. Males come from a French population located around Lyon called 'Mepieu' (N 45° 43' 47", E 5° 27' 18"). The individuals were housed in the laboratory (EcoAquatron University of Lyon, approved by the Veterinary Services; approval number 692661201) in individual terrariums (25 x 17 x 15 cm) with a water-filled basin and a tree branch. The terrariums were placed under a neon light (Exo Terra-Neon reptile Glo 5.0; 40 Watts; 30% UVA; 5% UVB) with timers set to guarantee 12 hours of light per days.

### **Experimental design and hormone manipulation**

At their arrival at the laboratory, the body mass of males was measured (balance DL-501, 0.01g, Denver Instrument, Sartorius). Males were distributed in 2 groups: C-males (control males, N = 29), and T-males (testosterone-supplemented males, N = 30) with attention to the equal mass distribution in the two groups. Testosterone was delivered transdermally to each T-male following the method used by Desprat et al. (2015). Briefly, the testosterone (number 86500, FLUKA analytical, Sigma-Aldrich) was diluted in commercial-grade sesame oil to obtain a 3 mg/ml hormone solution. T-males received 4.5 µl of hormone solution dorsally each day during the experiment, whereas C-males received an identical amount of sesame oil.

The first ten days of the experiment all males (C-males and T-males) were fed with 2 crickets (*Acheta domesticus*) to guarantee a similar energetic state for all males. The following ten days males were fasting in order to increase hunting motivation. The 20<sup>th</sup> day after the beginning of the experiment, a foraging behavior test was done on each males as describe below.

After experiments, all males were powered with 5 crickets during 3 days before being released at their originate pound.

### **Hormone analysis**

A saliva sample was obtained to determine the testosterone levels on each male before and after 20 days of hormonal manipulation. A cotton ball was directly introduced into a frog's mouth for 20 seconds. Cotton balls were weighed before and after sampling saliva, to deduct the amount of saliva. Then saliva was extracted from the cotton ball with the addition of 120 µL of a phosphate buffer (1 M phosphate solution containing 1% BSA, 4 M sodium

chloride, 10 mM EDTA and 0.1% sodium azide) and centrifugation. Testosterone analysis was performed in duplicate with a colorimetric 96-well testosterone Enzyme-Immuno Assay (EIA) kit (number 582701, Cayman Chemical). The coloration was evaluated using a spectrophotometer (Absorbance Microplate Reader ELx808, Biotek, France) at 405 nm wavelength. The concentration of testosterone in pg/mg of saliva was calculated using a standard curve for each plate. The EIA used to measure testosterone in the saliva was validated for use with *H. arborea* saliva (Desprat et al., 2015).

### **Foraging behavior test**

Each male was tested individually in arena (70 x 70 x 35 cm) whose floor was covered with a moist burlap cloth. We placed a screen computer (31 x 17.4 cm) on one side on the arena. The background was plain green and a virtual cricket moved on it. The program was coded in JavaScript and HTML5. The cricket's path is made in vector format (SVG) which is then transformed into an array used in JavaScript. Speed of the virtual cricket was stable at 120 cm per min. The path of the virtual cricket was determined by a random trajectory with restrains: the initial point has identical coordinates than the ending point, one loop lasts 20 sec and was repeated, no linear trajectory was allowed and the virtual cricket has to move in the inferior half part of the screen. At the beginning of the test, male was placed into a half opaque box (10cm diameter x 4 cm height). The box was placed at 30 cm perpendicularly front the screen in the middle of the arena.

The test occurred after 6 pm in a room with a reduced lighting (mimicking dusk ambience), virtual cricket program running on the screen. The male was maintained for 2 min inside the box. The box door was opened pulling a long line to avoid any interaction of the experimenter with the tested frog. Males were free of their movements in the arena. The behavioral sequence of attack is described as follow. Firstly the male orients his head in direction of the prey. Secondly, depending to the distance of the prey, male gets closer keeping head orientation on the moving prey. Thirdly, frog jumps on the prey. Fourthly male sticks his tongue out. The success of attack is defined as the tongue touches the virtual prey on the screen computer. We stopped the test after 5 attacks against the virtual cricket or after 10 min from the opening of the box. The test was video filmed and watched with Windows Live Media Player to control the time of each item of the behavioral sequence. We measured 1) the detection time (in s) – i.e. the time from the opening of the box and the head orientation, 2) the mean time of the attack latency over the 5 attacks – i.e. from the head orientation to the first sticking tongue out and 3) the attack success, i.e. the percentage of success over the 5 attacks.

Males who did not go out the central box during 10 min were discarded to the experimentation. Seventeen C-males and 16 T-males were successfully experimented.

### Statistics

The comparison of testosterone levels between groups (T-males and C-males) was performed using a Student test.

Because of the non-normality of the data distribution of the detection time and the attack duration, these two variables were log transformed. After that, the comparison of between groups (T-males and C-males) was performed using a Student test.

In addition the body mass, a morphological indicator, was added as another explanatory variable in linear models. For the linear models, residual normality, independence, and variance homogeneity were checked. For all of the statistical models, all the main effects and the interaction terms for each data set were fitted.

Data were analyzed using the statistical software package R 3.2.1 (R Development Core Team 2013).

## RESULTS

When males were captured on the pound at the beginning of the breeding season, both C- and T-males presented the same low testosterone levels in saliva (Student test, day 0,  $t = -0.93$ ,  $P = 0.37$ ; Fig. 1). After 20 days of daily hormonal manipulation, T-males presented a testosterone levels in saliva 8.7 fold upper than C-males (Student, day 20,  $t = -8.71$ ,  $P = 3.10^{-7}$ ; Fig. 1). Hence, when males performed the hunting behavior test, T-males and C-males have testosterone levels significantly different.

There was any correlation between measured variables: the first detection time, the attack latency and the score of success of attacks (Pearson, all  $P > 0.05$ ).

We found a significant effect of the testosterone on the detection time. Indeed, T-males first attacked more than two times faster than C-males (Student, log transformed values,  $t = 2.15$ ,  $P = 0.04$ ; Fig. 2A). However, there was no difference between the attack latency of T-males and C-males from the moment frog orients its head to its tongue touches the screen (Student, log transformed values,  $t = -0.66$ ,  $P = 0.52$ ; Fig. 2B). In addition, the score success attack of T-males and C-males was similar (Student,  $t = -0.45$ ,  $P = 0.65$ ; Fig. 2C).

Nevertheless, our results shown a significant interaction between the body mass at day 20 and the treatment on the attack duration of frogs (lm, log transformed values, body mass x treatment,  $F = 9.41$ ,  $P = 0.005$ ; Fig. 3). For C-males, there was a significant effect of body mass on the attack latency ; small C-males attacked faster than bigger one (Pearson,  $r^2 = 0.56$ ,

$t = 2.6$ ,  $P = 0.02$ ). However, there was no correlations between the body mass and the attack latency on T-males (Pearson,  $r^2 = -0.41$ ,  $t = -1.68$ ,  $P = 0.11$ ). Hence, testosterone increased the attack duration on small males ( $< 4.0$  g). C-males and T-males with a high body mass had similar attack duration. The body mass at the 20<sup>th</sup> day was independent of the treatment (Student,  $t = -1.49$ ,  $P = 0.15$ ;  $3.91 \text{ g} \pm 0.66$  and  $4.36 \text{ g} \pm 1.03$  for C-males and T-males respectively).

## DISCUSSION

Our results show a significant effect of testosterone on the hunting behavior of the European tree frog *H. arborea*. Although there was no difference of the hunting success between groups, T-males first attacked faster than C-males. The behavioral sequence of attack was related to the body mass of frog: testosterone enhanced the attack duration on small males but have no effect on big ones.

### Testosterone improves the alertness

In our study males were placed in an arena front of a screen with a virtual cricket moved on it. The hunting test began at the moment frog was released. We found that the time corresponding to the difference between the first attack and the opening box was testosterone dependent. T-males seemed more watchful and the first detection time was shorter than C-males. Indeed, sexual hormone steroids have been found to have diverse effects on perception, attention and visuospatial processes involved during foraging behavior (Neave 2008). Testosterone effects on cognitive function have been largely studies principally in rats and birds (see the meta-analysis Pfannkuche et al. 2009). In non-human primates *Macaca mulatta*, Lacreuse et al. (2012) found that testosterone modulated visual recognition memory independently of the delay duration of the stimuli, suggesting that testosterone increases vigilance and alertness. Among *Pan troglodytes* males, higher levels of testosterone correlated with higher levels of performance in the physical cognition division on the whole, as well as with the space and causality scales (Wobber and Herrmann 2014). To our knowledge, our study is the first one on the testosterone effects on frog cognition and it could be interesting to generalize our results on other species.

### Testosterone decreases foraging motivation on small males

In our study, we found that C-males' attack duration was shorter in small males than in males with higher body mass. Energetic reserves seem be one of the triggering factors for foraging behavior. Before to be tested, males fasted during 10 days in order to increase their

motivation to hunt. In tree frogs, the breeding season is often associated with spontaneous fasting during the calling nights (Friedl and Klump 2005). Below a threshold in body reserves, hormonal and metabolic shift characteristics of a switch from lipid to protein utilization occur. We found that fasting more improves the hunting motivation in small males than in big males probably because there are less energetic reserves in small males than big ones. This could affect the reproductive behavior of males. Brepson et al. (2012) have shown that the use of a parasitic reproductive tactic is often determined by male condition; low condition males using more often this kind of tactic than high condition ones. Brepson et al. (2013) have investigated display trade-offs in *H. arborea* manipulating their energetic constraint through starvation/feeding experiments. When focusing on individual responses, it appeared that males cannot maintain both calling activity and within-bout call rate. Big and high-condition males mainly decrease this call property along the experiment, whereas small and low-condition males mainly decrease calling activity. These results suggest that calling activity is costlier to maintain than call properties but may confer a greater advantage in mating success, leading to different allocation strategies among males of different conditions.

In addition, our results showed an interaction of the treatment and the body mass of males on the attack duration. That means that the testosterone effect was not similar on small and big males. Indeed, testosterone increased the attack duration (like decreasing the attack motivation) on males with small body mass compared to C-males, but had no effect on big ones. This result could be explained in two ways. Corticosterone is a stress hormone which increases during the time spent on the pond (Burmeister and Wilczynski 2000). When energetic reserves are impacted with calling activity, this hormone could enhance the motivation of males to looking for food outside the pond. Hence, first, testosterone might attenuate the corticosterone effect on stimulation on the foraging behavior because of their competition for the same humoral receptor on cells (Owen-Ashley et al. 2004). Secondly, testosterone stimulates the calling behavior during the breeding season (Desprat et al. 2015). As, the acoustic signals on frog are very costly on term of energy (Marler 1996 ; Desprat et al. unpublished data) and investing energy in foraging reduces the amount of energy immediately available for growth or reproduction ; males have to trade off between these two behaviors (Blanckenhorn et al. 1995). If foraging is successful, more energy is ultimately available for increasing biomass and sexual signal expression. Hence, leaving the pond is a risk behavior because of the unknown foraging success; although staying on the pond could increase the individual fitness. In *Hylocharis leucotis*, a recent study shows that males with higher testosterone levels behave as risk-prone foragers (Chavez-Zichinelli et al. 2014).

### **Testosterone and attack success**

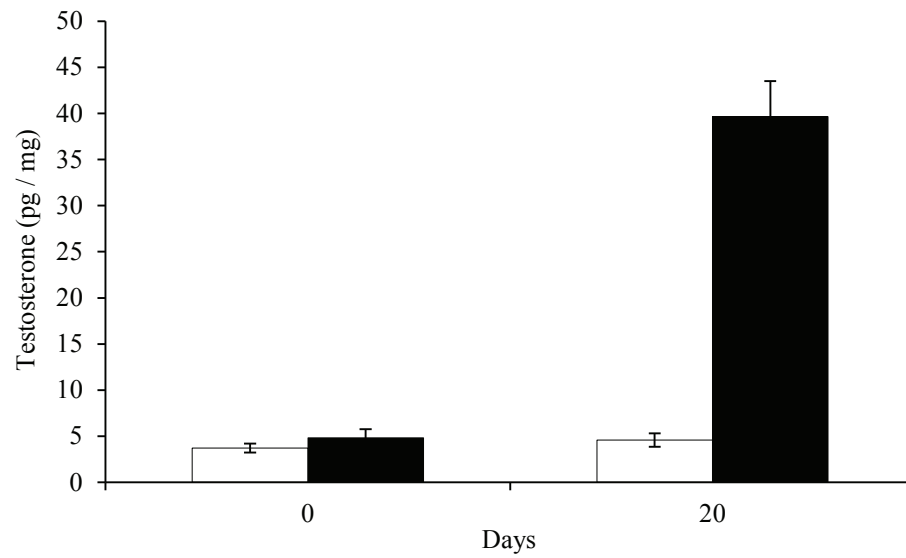
Contrary to what is expected, T-males did not increase their success attack compared to C-males (approximately 35% of success). This low level of success is surprising; especially because frogs are usually good hunters in low lighting conditions due to their speed retinal ganglion cell responses (Aho et al., 1993).

Foraging theory's central premise assumes that behavioral actions that affect the acquisition of food also ultimately affect fitness (Blanckenhorn 1991). In insects, males' spermatophore is directly linked to their foraging ability and contributes to increase the reproduction success of males (Belowsky et al., 1996). In *Anthus sp. spinoletta*, reproductive success increased with biomass in food patches chosen (Frey-Ross et al. 1995). As suggested by Frey-Ross et al. (1995), with food having such strong influence on fitness related traits, we can assume that selection has produced phenotypes which forage in a way that guarantees the best achievable balance between cost and benefits. Moreover, in some species, female mate choice is based on carotenoid-based coloration of males and because carotenoids were exclusively obtained through food intake, the coloration could be regarded as a reliable indicator of the individual foraging ability for carotenoid richest foods (Karino et al. 2005). In *H. arborea*, males contribute nothing beyond their sperm and females are expected to choose males based on « indirect benefits » (Andersson 1994). Hunting success of males may permit them to increase carotenoid intake used for visual sexual signal and energetic supply to support the cost of vocal sexual signal.

### **Conclusion**

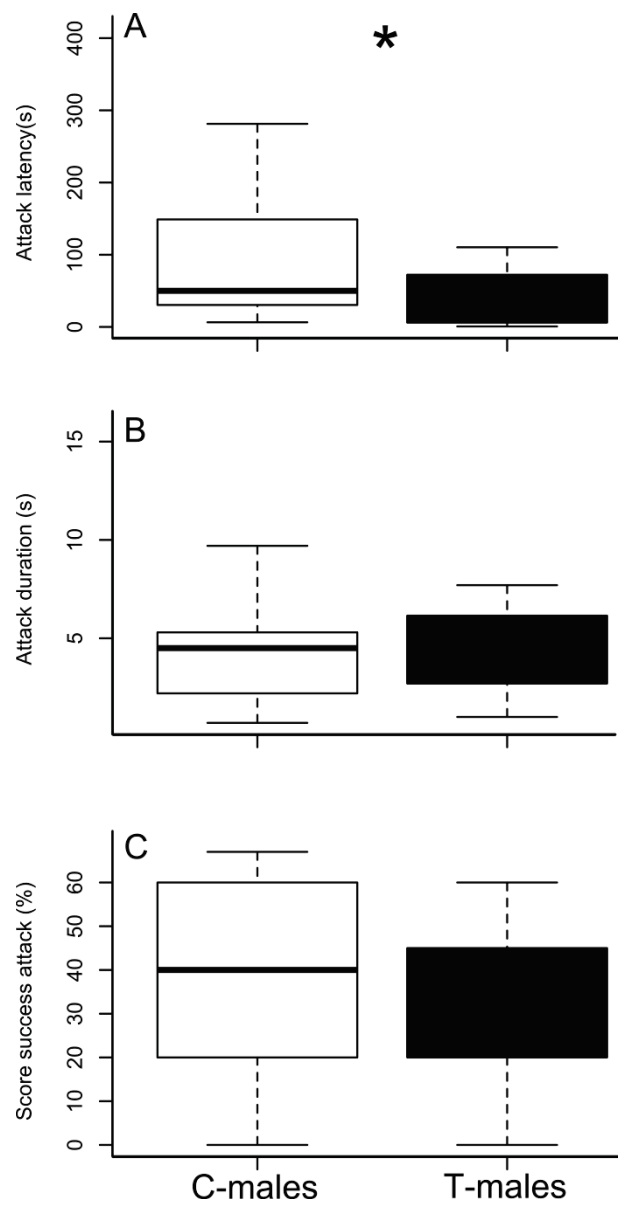
To conclude, 20 days of hormonal supplementation permitted to highlight testosterone implications in foraging behavior of *H. arborea*. Indeed, testosterone enhanced alertness and reduced latency to first attack of male in a virtual hunting behavior test. On the other hand, in our experimental condition, there was no difference between the foraging success of T-males and C-males or big males and small males were similar. While our experiment allows ensuring the same motivation for all tested males, it is far from the *natura* hunting conditions. Tree frogs are « sit and wait » predator eating moving insects and larvae. Whereas in our experiment the target prey always remain closed to the tested males, in *natura* the moving prey probably disappeared promptly and hence the alertness is a key compound of foraging efficiency.

## FIGURES

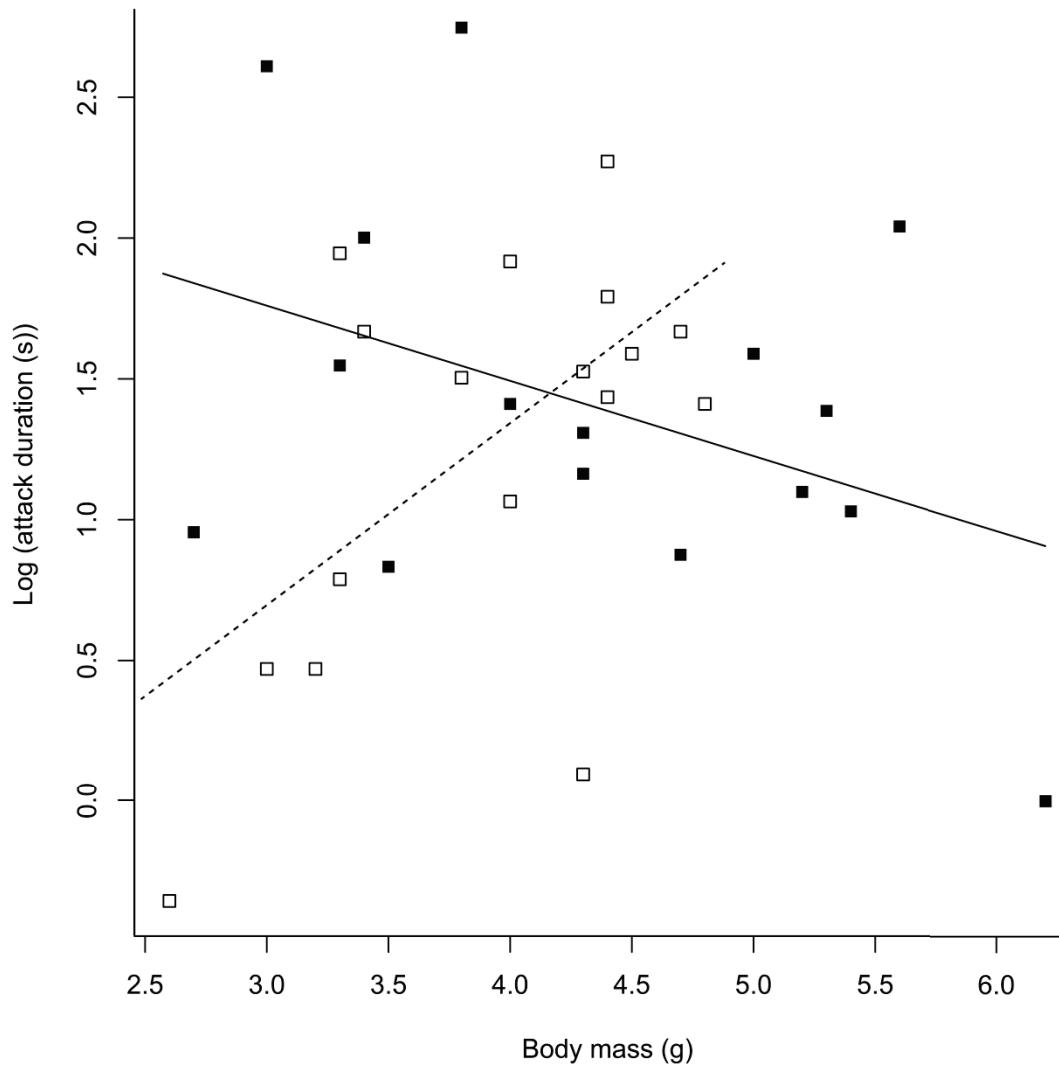


**Figure 1:** Testosterone levels in saliva in pg/mg before and after 20 days of male testosterone level manipulation by daily application of 13.5µg of testosterone on the back of the *H. arborea* (N = 33). C-males are represented in white, T-males in black. Bars indicate s.e.m. \*  $P < 0.05$  on log transformed value.





**Figure 2:** Boxplot representing the measured variables during the hunting behavior test : the detection time (A), the attack duration (B) and the score success attack (C) for C-males (in white) and T-males (in black). N = 33. (Horizontal line: median value, box ends : upper and lower quartiles, whiskers : maximum and minimum values). \*  $P < 0.05$  on log transformed value.



**Figure 3:** Effect of the interaction between treatment and male body mass at day 20 on the log transformed values of the attack duration (in s) of *H. arborea*.  $N = 33$ . Predictions of the linear model for the significant interaction between the 2 explanatory variables (body mass and testosterone treatment) are represented in dotted and full lines for C-males (white squares) and T-males (black squares) and, respectively. The equations of the lines are  $y = 0.6 x - 1.1$  and  $y = -0.3 x + 2.6$  for C-males and T-males respectively. Only the slope of C-males was significantly different to zero (see main text).

## REFERENCES

- Aho, A. C., K. Donner, S. Helenius, L. O. Larsen, and T. Reuter. 1993. Visual performance of the toad (*bufo-bufo*) at low-light levels - retinal ganglion-cell responses and prey-catching accuracy. *Journal of Comparative Physiology A* 172 : 671-682.
- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton university press, Princeton.
- Belovsky, G. E., J. B. Slade, and J. M. Chase. 1996. Mating strategies based on foraging ability : An experiment with grasshoppers. *Behavioral Ecology* 7 : 438-444.
- Bevier, C. R. 1997. Utilization of energy substrates during calling activity in tropical frogs. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41 : 343-352.
- Blanckenhorn, W. U., R. F. Preziosi, and D. J. Fairbairn. 1995. Time and energy constraints and the evolution of sexual size dimorphism - to eat or to mate. *Evolutionary Ecology* 9 : 369-381.
- Blanckenhorn, W. V. 1991. Fitness consequences of foraging success in water striders (*Gerris remigis* ; Heteroptera : Gerridae). *Behavioral Ecology* 2:46-55.
- Blas, J., L. Perez-Rodriguez, G. R. Bortolotti, J. Vinuela, and T. A. Marchant. 2006. Testosterone increases bioavailability of carotenoids : Insights into the honesty of sexual signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 : 18633-18637.
- Brepson, L., M. Troianowski, Y. Voituron, and T. Lengagne. 2012. Cheating for sex : Inherent disadvantage or energetic constraint ? *Animal Behaviour* 84 : 1253-1260.
- Brepson, L., Y. Voituron, and T. Lengagne. 2013. Condition-dependent ways to manage acoustic signals under energetic constraint in a tree frog. *Behavioral Ecology* 24 : 488-496.
- Burmeister, S. and W. Wilczynski. 2000. Social signals influence hormones independently of calling behavior in the treefrog (*Hyla cinerea*). *Hormones and Behavior* 38 : 201-209.
- Carre, J. M. and C. M. McCormick. 2008. Aggressive behavior and change in salivary testosterone concentrations predict willingness to engage in a competitive task. *Hormones and Behavior* 54 : 403-409.
- Chavez-Zichinelli, C. A., L. Gomez, R. Ortiz-Pulido, C. Lara, R. Valdez, and M. C. Romano. 2014. Testosterone levels in feces predict risk-sensitive foraging in hummingbirds. *Journal of Avian Biology* 45 : 501-506.
- Chew, B. P. and J. S. Park. 2004. Carotenoid action on the immune response. *Journal of Nutrition* 134 : 257S-261S.
- Cote, J., S. Meylan, J. Clobert, and Y. Voituron. 2010b. Carotenoid-based coloration, oxidative stress and corticosterone in common lizards. *Journal of Experimental Biology* 213 : 2116-2124.
- Desprat, J. L., T. Lengagne, A. Dumet, E. Desouhant, and N. Mondy. 2015. Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog : Trade-off between sexual signals and immunity ? *Behavioral Ecology* 26 : 1138-1146.

- Folstad, I. and A. J. Karter. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* **139** : 603-622.
- Frey-Roos, F., P. A. Brodmann, and H. U. Reyer. 1995. Relationships between food resources, foraging patterns, and reproductive success in the water pipit, *anthus spinoletta*. *Behavioral Ecology* **6** : 287-295.
- Friedl, T. W. P. and G. M. Klump. 2005. Sexual selection in the lek-breeding European treefrog : body size, chorus attendance, random mating and good genes. *Animal Behaviour* **70** : 1141-1154.
- Gomez, D., C. Richardson, T. Lengagne, S. Plenet, P. Joly, J. P. Lena, and M. Thery. 2009. The role of nocturnal vision in mate choice : females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **276** : 2351-2358.
- Hill, G. E. and K. J. McGraw. 2004. Correlated changes in male plumage coloration and female mate choice in cardueline finches. *Animal Behaviour* **67** : 27-35.
- Huyghe, K., J. F. Husak, I. T. Moore, B. Vanhooydonck, R. Van Damme, M. Molina-Borja, and A. Herrel. 2010. Effects of testosterone on morphology, performance and muscle mass in a lizard. *Journal of Experimental Zoology Part A* **313A** : 9-16.
- Karino, K. and S. Shinjo. 2007. Relationship between algal-foraging ability and expression of sexually selected traits in male guppies. *Zoological Science* **24** : 571-576.
- Karino, K., S. Shinjo, and A. Sato. 2007. Algal-searching ability in laboratory experiments reflects orange spot coloration of the male guppy in the wild. *Behaviour* **144** : 101-113.
- Karino, K., T. Utagawa, and S. Shinjo. 2005. Heritability of the algal-foraging ability : an indirect benefit of female mate preference for males' carotenoid-based coloration in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59** : 1-5.
- Lacreuse, A., H. E. Gore, J. Chang, and E. R. Kaplan. 2012. Short-term testosterone manipulations modulate visual recognition memory and some aspects of emotional reactivity in male rhesus monkeys. *Physiology & Behavior* **106** : 229-237.
- Marler, C. A. and M. J. Ryan. 1996. Energetic constraints and steroid hormone correlates of male calling behaviour in the tungara frog. *Journal of Zoology* **240** : 397-409.
- Maynard Smith, J. and D. G. C. Harper. 1995. Animal signals : Models and terminology. *Journal of Theoretical Biology* **177** : 305-311.
- Mougeot, F., A. Dawson, S. M. Redpath, and F. Leckie. 2005. Testosterone and autumn territorial behavior in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Hormones and Behavior* **47** : 576-584.
- Neave, N. 2008. Hormones and behaviour : A psychological approach. Cambridge University Press, Cambridge.
- Olson, V. A. and I. P. F. Owens. 1998. Costly sexual signals : Are carotenoids rare, risky or required ? *Trends in Ecology & Evolution* **13** : 510-514.

- Owen-Ashley, N. T., D. Hasselquist, and J. C. Wingfield. 2004. Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis : Unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *American Naturalist* **164** : 490-505.
- Pfannkuche, K. A., A. Bouma, and T. G. G. Groothuis. 2009. Does testosterone affect lateralization of brain and behaviour ? A meta-analysis in humans and other animal species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **364** : 929-942.
- Pough, F. H., W. E. Magnusson, M. J. Ryan, K. D. Wells, and T. L. Taigen. 1992. Behavioral energetics. *in* *Environmental Physiology of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago. pp 395-436
- Richardson, C. and T. Lengagne. 2010. Multiple signals and male spacing affect female preference at cocktail parties in treefrogs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **277** : 1247-1252.
- Setchell, J. M. 2005. Do female mandrills prefer brightly colored males ? *International Journal of Primatology* **26** : 715-735.
- Wobber, V. and E. Herrmann. 2014. The influence of testosterone on cognitive performance in bonobos and chimpanzees. *Behaviour* **152** : 407-423.
- Zahavi, A. 1977. Cost of honesty - (Further remarks on handicap principle). *Journal of Theoretical Biology* **67** : 603-605.

## DISCUSSION

### **I/ Les hormones, outils idéal pour une approche intégrative**

Mon travail s'inscrit dans le domaine de l'écologie évolutive qui a pour but de comprendre comment les traits biologiques sont contrôlés par la sélection naturelle et la sélection sexuelle. Dans ce domaine, les mécanismes physiologiques sous-jacents à la modulation de ces traits sont souvent ignorés. Bien que fréquemment évoquées, les approches évolutives en écologie et mécaniques en physiologie sont rarement examinées dans une même étude. Or, comprendre les mécanismes proximaux des variations inter-individuelles, inter-populationnelles et inter-spécifiques va permettre de prédire la nature adaptative de ces traits et les contraintes qui en ont limité l'évolution (Rose et Bradley, 1998).

Le système endocrinien (et neuroendocrinien) permet à l'organisme de collecter l'ensemble des informations de l'environnement, d'intégrer ces informations et enfin, de signaler au tissu concerné la valeur du trait à produire. Au sein de ce système, la majorité des informations sont véhiculées par le biais des hormones sécrétées et la réception des messages au niveau des tissus est due à la présence de récepteurs hormonaux. Les hormones apparaissent donc comme l'outil idéal pour comprendre les variations des traits d'histoire de vie et leurs conséquences sur la valeur sélective des individus. Ainsi est apparue récemment une nouvelle discipline, « l'endocrinologie environnementale » (Bradshaw, 2007 ; Wingfield, 2008) qui consiste à mesurer les niveaux hormonaux *in natura* afin de nous aider à comprendre la nature des réponses des animaux aux exigences de leur environnement. Ces développements ont été possibles grâce à la mise au point de différents dosages non invasifs et au développement de l'ingénierie phénotypique. Mes travaux de thèse s'inscrivent clairement dans cette voie.

Dans un contexte de sélection sexuelle, je me suis focalisée sur l'étude de la testostérone chez les mâles. Cette hormone stéroïde, en plus de stimuler la gamétogenèse (exemple Amory et Bremner, 2003 ; Müller et al., 2014), est connue pour avoir de nombreux effets sur le comportement (agressions inter-mâles, sollicitation du partenaire) et l'expression des signaux sexuels.

### **II/ Implications physiologiques de la testostérone sur la production de signaux acoustiques**

Nos résultats montrent que le chant des mâles *Hyla arborea* est testostérone-dépendant (Desprat et al., 2015, article 2). En effet, après 20 jours de supplémentation en testostérone, les mâles chantent plus grave avec des séquences de chant plus longues que celles des

individus témoins. Il est connu que le chant des mâles durant la période de reproduction est une activité très coûteuse en termes d'énergie et de temps (Ilany et al., 2013), en particulier chez la rainette arboricole (Grafe et Thein, 2001). La contrainte énergétique est d'autant plus importante chez les individus qui doivent faire un compromis entre le temps passé sur la mare à chanter pour attirer des femelles et celui de quitter le lieu de reproduction pour aller chasser (*To eat or to mate*, Blanckenhorn et al., 1995). En effet, le mâle qui chante ne peut allouer que très peu de temps à la recherche et à l'acquisition de nourriture. Selon leur réserve énergétique, les mâles *H. arborea* peuvent continuer à chanter durant une dizaine de jours en moyenne sur la mare sans nouvel apport alimentaire (Friedl et Klump, 2005). La production d'un signal acoustique chez *H. arborea* est majoritairement due à la contraction très rapide des muscles du tronc qui permettent d'expulser l'air contenu dans les poumons à travers les cordes vocales jusqu'au sac vocal (Pough et al., 1992). Afin de comprendre les mécanismes d'action de la testostérone sur les muscles du chant d'*H. arborea* dans un contexte réaliste, nous avons pour la première fois étudié l'effet de cette hormone couplé à la restriction calorique, à la fois sur les caractéristiques biomécaniques des muscles (force de contraction, fatigabilité) mais aussi sur le fonctionnement mitochondrial afin de savoir comment le rendement énergétique mitochondrial s'ajuste à des contraintes nutritionnelles et hormonales. Nous avons mené une approche intégrative puisque ces différents paramètres (chant, biomécanique des muscles et physiologie de la mitochondrie) ont été mesurés sur le même individu qui nous a permis de montrer que le fonctionnement mitochondrial était directement lié aux caractéristiques contractiles des muscles et aux caractéristiques acoustiques du chant.

La restriction calorique que nous avons imposée à nos animaux a induit une perte de masse comparable à celle observée dans la nature (Cherry, 1993). Cette perte de masse a été observée de façon similaire sur l'individu entier et sur les muscles du tronc. En 2003, Girgenrath et Marsh ont montré que des mâles *H. chrysoscelis* nourris *ad libitum* et supplémentés en testostérone présentaient une augmentation de la masse musculaire associée à des propriétés contractiles élevées (durée de contraction plus rapide de 30% par rapport aux individus témoins). Dans notre étude nous ne retrouvons pas ce type de résultats - l'effet de la restriction calorique masquant probablement l'effet de la supplémentation en testostérone. Par contre, nos résultats montrent une réduction de la durée du plateau de la courbe enregistrée lors d'un téтанos chez les mâles supplémentés en testostérone (Figure 1, article 3). Cela suggère que les isoformes des fibres sollicitées ne sont pas les mêmes que chez les individus témoins. En effet, il existe plusieurs types de fibres musculaires qui n'ont pas les mêmes propriétés contractiles (Putnam et Bennett, 1983 ; Nagesser et al., 1992 ; Lutz et Lieber, 2000). Les FG, *fast glycolytic*, sont capables de se contracter rapidement et fortement sur une



courte période (métabolisme anaérobie). Les SO, *slow oxydative*, sont capables de se contracter sur une longue période à une faible intensité (métabolisme aérobie). Il existe aussi des fibres intermédiaires (FOG, *fast oxydative glycolytic*) capables de se contracter longtemps à une forte intensité. Le phénotype musculaire est plastique : il peut s'adapter face à une contrainte environnementale, à des toxines ou avec l'entraînement (Holmes et al., 2007). La testostérone pourrait induire des modifications au niveau du phénotype des fibres musculaires des muscles du tronc. La testostérone augmenterait le nombre de fibres type FOG (fibres très présentes chez *H. versicolor* en période de reproduction par exemple, Marsh et Taigen, 1987) par rapport aux individus ayant un faible taux de testostérone. De telles modifications du phénotype ont été montrées dans les muscles cardiaques, soléaires et de la patte postérieure chez le rat (Egginton, 1987) et sur les muscles de l'axe caudal chez le lézard (Holmes et al., 2007). Chez le Xénope (*Xenopus laevis*), il a été montré que la testostérone affecte le nombre et la distribution des fibres musculaires dans le membre antérieur mis à contribution lors de l'amplexus entre le mâle et la femelle (Rubinstein et al., 1983). Ces études suggèrent que les hormones stéroïdes peuvent jouer un rôle important dans la détermination phénotypique des fibres musculaires notamment des muscles dimorphiques (différents entre les mâles et les femelles). Des études de typage des muscles après supplémentation en testostérone pourraient permettre de tester cette hypothèse. Il serait alors possible que des changements de concentration en hormones androgènes au moment de la saison de reproduction entraînent un changement d'activité de certains motoneurones permettant d'augmenter les performances acoustiques des mâles (Schultz et Schlinger, 1999). Ces modifications phénotypiques confèrent indubitablement un avantage évolutif aux animaux.

Pour fonctionner, les muscles ont besoin d'énergie (ATP) qui provient essentiellement des mitochondries. Afin d'étudier le fonctionnement des mitochondries des muscles du chant, nous avons utilisé directement des fibres perméabilisées, et non pas des mitochondries isolées, de manière à se rapprocher le plus possible des conditions normales dans lesquelles les mitochondries fonctionnent (organisation en réseau, Fongy et al., 2013). Les résultats obtenus montrent que les mitochondries provenant des muscles de mâles en restriction calorique (comparaison des mâles en début et des mâles en fin d'expérimentation) ont mis en place des mécanismes permettant d'améliorer le fonctionnement mitochondrial. En effet, une plus grande proportion de la consommation d'oxygène est allouée à la production d'ATP. Ce mécanisme permet d'augmenter l'énergie utile disponible pour l'animal. De la même façon, les mitochondries des mâles supplémentés en testostérone ont une part de l'oxygène consommée pour la production d'ATP plus importante que celles issues des mâles témoins. La fuite des protons de la chaîne respiratoire mitochondriale représente une part d'énergie qui

ne pourra pas être allouée à la production d'ATP par l'ATP synthase. Il existe plusieurs mécanismes pouvant limiter les fuites de protons soit en modifiant la fluidité de la membrane soit en diminuant l'expression de protéines telle que l'adénosine nucléotide translocase (Ash et Merry, 2011). De telles modifications sont réalisables en 20 jours voire moins (Kayes et al., 2009). Pour une production d'ATP équivalente, il est généralement accepté qu'elle augmente le métabolisme basal. Chez le rat, la fuite de protons peut représenter jusqu'à 20% de la consommation d'oxygène qui ne sera pas transformée en ATP (Rodrigues et al., 2010). Lorsque le métabolisme est bas (animal au repos), la modulation des fuites de protons entraîne une augmentation de la production de ROS (Rodrigues et al., 2010). La testostérone, en limitant les fuites de protons, permet aux mitochondries des mâles chanteurs d'améliorer leur efficacité et pour une même consommation d'oxygène de pouvoir produire plus d'ATP. Chez *H. arborea*, il a d'ailleurs déjà été montré que les mâles les plus gros avaient besoin de consommer moins d'oxygène que les petits pour produire des chants de qualité équivalente (Voituron et al., 2012). Ce mécanisme permettrait aux mâles ayant de forts taux de testostérone d'améliorer leur activité musculaire responsable du chant et de produire un signal acoustique de meilleure qualité.

### **III/ La testostérone, médiatrice du signal visuel chez *Hyla arborea*?**

La couleur jaune orangé du sac vocal d'*H. arborea* semble indiquer que ce signal est lié à la présence de caroténoïdes dans le tégument. Dans une précédente étude, Richardson et al. (2009) ont analysé la composition du sac vocal par HPLC et ont mis en évidence la présence de 3 pigments caroténoïdes. Nous avons complété ce travail à l'aide d'un UHPLC-DAD qui permet de séparer efficacement les différents isomères de caroténoïdes (Li et al., 2007 ; Hsu et al., 2012). Onze caroténoïdes ont ainsi pu être détectés dans le sac vocal dont certains très apolaires. Néanmoins, de manière surprenante, nous n'avons pas pu mettre en évidence un lien entre la quantité de caroténoïdes dans le sac vocal et sa couleur mais plutôt une corrélation entre la quantité de caroténoïdes circulant (plasma) et la couleur du sac vocal. Le compromis d'allocation des caroténoïdes entre la fonction ornementale et immunitaire impose que la partie des caroténoïdes non associée à l'immunité puisse être expliquée par la coloration (Blas et al., 2006). De ce fait, une fraction des caroténoïdes circulants peut être responsable de la couleur du sac vocal. D'autre part, la couleur du sac vocal n'est peut-être pas expliquée par la totalité des caroténoïdes présents dans le sac vocal mais, probablement, que seulement certains caroténoïdes ont cette fonction, comme les caroténoïdes les plus apolaires spécifiques du sac vocal. Cependant, les caroténoïdes ne sont pas les seuls types de pigments responsables de la couleur chez les animaux. D'autres pigments comme les ptérides,

avec des propriétés spectrales similaires aux caroténoïdes, sont présents dans les exosquelettes et les ailes des insectes, l'iris des oiseaux ou sur les téguments des poissons, des lézards et des amphibiens. Par exemple, la couleur orange des guppys (*P. reticulata*) ne dépend pas uniquement des pigments caroténoïdes mais également de la présence de ptérines dans le tégument (Grether et al., 2001). Contrairement aux caroténoïdes, les ptérines sont synthétisables *de novo* par l'organisme. Les ptérines sont relativement riches en atomes d'azote et considérées comme étant peu coûteuses à produire (Grether et al., 2001 ; McGraw, 2005). Puisqu'il s'agit principalement de sous-produits métaboliques, les ptérines sont considérées comme des substances du système excréteur qui ont ensuite été utilisées pour la coloration (revue par Kemp et al., 2011). Jusqu'alors, peu d'études ont porté sur l'interaction des deux pigments sur la teinte observée, hormis chez les guppys (*P. reticulata*, Grether et al., 2005). Il serait intéressant de déterminer le rôle des ptérines pour la couleur du sac vocal des mâles chez *H. arborea*, si ces pigments sont présents.

Par ailleurs, le travail mené au cours de cette thèse nous a permis de confirmer que la coloration du sac vocal est, comme le signal acoustique, dépendante de la teneur en testostérone des mâles (Desprat et al., 2015, article 2). En effet, les individus ayant expérimenté une supplémentation en testostérone pendant 20 jours ont un sac vocal plus foncé que les individus témoins qui ont vu la couleur de leur sac vocal pâlir au cours de l'expérimentation. En revanche, contrairement à l'étude de Blas et al. (2006), nous n'avons pas observé d'effet de la testostérone sur la variation des quantités de caroténoïde dans le foie (organe de stockage), le plasma et le sac vocal. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que c'est le chroma (paramètre de saturation de la couleur n'étant pas affecté par la teneur en testostérone des mâles) qui est lié à la présence de caroténoïdes dans le plasma. Nous pouvons également supposer que l'effet de la testostérone sur la couleur soit le résultat de l'effet de la testostérone sur d'autres pigments que les caroténoïdes, comme les ptérines. De plus, dans notre expérimentation sur l'effet de la testostérone sur les caroténoïdes, les individus sont issus d'un sous-échantillonnage aléatoire de l'expérimentation sur l'effet de la testostérone sur les signaux sexuels (Desprat et al., 2015, article 2). Le nombre d'individu pris en compte dans nos expérimentations est limité par le comité d'éthique puisqu'elles nécessitent la mise à mort d'individus issus d'une espèce protégée. Avec 8 individus par groupes, la puissance de notre test statistique ayant permis de mettre en évidence l'effet de la testostérone sur la couleur du sac vocal avec 20 individus est peut-être trop faible.

#### **IV/ Testostérone et comportement de chasse : effet indirect sur la production des signaux sexuels ?**

La production de ces signaux sexuels secondaires chez *H. arborea* est fortement dépendante des capacités d'approvisionnement des mâles puisque c'est l'apport alimentaire qui va permettre aux mâles de supporter les coûts énergétiques du chant et assurer un apport en caroténoïdes en partie nécessaires à l'expression du signal sexuel visuel. Les rainettes arboricoles sont des prédateurs dont le régime alimentaire se compose principalement d'aranéides et de coléoptères toute l'année mais les débris stomacaux analysés ont également montré la présence d'isopodes, d'hétéroptères, d'homoptères, de larves de coléoptères et de lépidoptères, d'imago de trichoptères, de brachycères et de nématocères et d'hyménoptère en fonction des périodes de l'année (Kovacs et al., 2007). Les rainettes ont un mode de chasse à l'affût (type *sit-and-wait*) principalement perchées dans les arbres.

Connaissant les effets positifs de la testostérone sur les comportements reproducteurs (Fusani, 2008), les comportements d'agression (Gould et Ziegler, 2007), la défense de territoire (Mougeot et al., 2005 ; Edler et al., 2011), nous avons étudié les effets d'une supplémentation en testostérone sur le comportement de chasse des mâles qui pourrait, ainsi, agir indirectement sur les signaux sexuels. Contrairement à nos prédictions, le taux de succès des attaques des mâles n'est pas dépendant de leur teneur en testostérone. Dans le cadre de nos expérimentations, le succès d'une attaque est déterminé par le fait que la langue du mâle se superpose avec la surface du grillon virtuel sur l'écran. Nous avons obtenu un succès d'attaque moyen de 35% pour l'ensemble des individus. Cependant, en milieu naturel, lorsque la projection de la langue ne touche pas directement le corps de la proie, elle pourrait néanmoins perturber le support ou le vol de la proie et mener à un succès de l'attaque.

Une fois introduits dans le système de test, les mâles supplémentés en testostérone attaquent deux fois plus vite que les mâles témoins. D'un point de vue comportemental, ce résultat suggère une vigilance accrue de ces mâles qui en milieu naturel pourrait aboutir à un succès d'attaque plus élevé. Étant donné leur mode de chasse plutôt opportuniste, la variabilité du succès d'approvisionnement alimentaire des individus tient principalement des capacités d'attention et de vigilance de l'animal à détecter une proie dans un environnement. Puisque les rainettes ne poursuivent pas leurs proies, une attaque qui n'atteint pas la cible du premier coup laisse l'opportunité à la proie de s'échapper. Cette proie en mouvement peut rapidement disparaître du champ visuel du prédateur. Une meilleure vigilance réduisant le temps de latence de l'attaque augmenterait alors les probabilités de succès. Le rôle de la testostérone sur les capacités cognitives, la mémoire, l'apprentissage et l'orientation spatiale, principalement étudié chez les primates non-humains (Lacreuse et al., 2012), peut en partie

expliquer nos résultats. L'effet de la testostérone sur les capacités d'approvisionnement alimentaire permet d'augmenter la masse et la qualité des signaux sexuels. Ces effets se répercutant sur le choix des femelles, les meilleurs chasseurs devraient donc avoir une meilleure *fitness* (Bailey et al., 2010). En choisissant un mâle sur la base de signaux sexuels coûteux en énergie ou en pigments non-synthétisables, la femelle s'assure de la capacité du mâle à rechercher de la nourriture de manière efficace. Dans l'hypothèse où cette performance d'approvisionnement alimentaire serait héréditaire (Karino et al., 2005), la femelle obtiendrait des bénéfices indirects pour sa descendance.

Dans notre expérimentation, pour motiver les individus à répondre au stimulus visuel du grillon virtuel, les mâles ont jeûné durant 10 jours. Cette période de jeûne est compatible avec l'histoire de vie de *H. arborea* (Friedl et Klump, 1997). L'effet de la testostérone sur la motivation à chanter (Desprat et al. 2015, article 2), peut expliquer la diminution de la motivation à chasser durant la période de reproduction. En effet, il y a un compromis d'allocation du temps entre manger ou se reproduire (Blanckenhorn et al., 1995). En revanche, la motivation à chasser augmente lorsque les réserves énergétiques de l'animal diminuent (Blanckenhorn et al., 1995). C'est également ce que suggèrent nos résultats car nous observons un effet de la masse sur la durée de l'attaque une fois la proie détectée chez les individus témoins ; les petits mâles témoins ont un temps d'attaque plus court que les gros. Nous pouvons traduire ce comportement par une motivation accrue des individus les plus maigres à acquérir de la ressource alimentaire. La durée de l'attaque des individus supplémentés en testostérone n'est pas différente de celle des individus témoins. En revanche, parmi les mâles les plus petits (i.e. avec des réserves énergétiques faibles) les mâles supplémentés en testostérone ont une durée d'attaque augmentée (i.e. une motivation à chasser réduite), alors que la durée d'attaque des gros mâles n'est pas affectée par la testostérone. Ces résultats sont inattendus, ils vont à l'encontre de notre hypothèse initiale et leur interprétation est confuse.

Notre expérimentation a été menée au milieu de la saison de reproduction et tous les soirs, les mâles étaient stimulés par un enregistrement d'un chœur diffusé dans la salle d'élevage afin de conserver leurs comportements reproducteurs et de mimer l'environnement acoustique naturel. Au moment de la reproduction, la testostérone est connue pour amplifier les comportements reproducteurs, dont le chant des mâles chez cette espèce (Desprat et al., 2015, article 2). L'augmentation de la testostérone et ses effets sur le comportement de chant pourraient masquer les effets d'autres hormones sur l'expression du comportement de chasse. En effet, le comportement de recherche alimentaire pourrait également être motivé par les

variations d'un cocktail d'autres hormones, comme l'augmentation de la corticostérone ou la diminution de l'arginine vasopressine (Spée et al., 2010 ; Voituron et al., 2012).

## **V/ Testostérone et immunité**

L'une des hypothèses de l'ICHH est que l'augmentation de la testostérone nécessaire à la mise en place des caractères sexuels secondaires entraîne une immunodéficience, traduisant le coût associé à la testostérone. L'effet de la testostérone sur le système immunitaire a été de nombreuses fois testé, à la fois lors d'études cliniques sur l'homme, mais également au cours d'expérimentations animales (revue par Trigunaite et al., 2015). Ces études ont clairement montré un rôle immunosuppresseur de la testostérone sur différents composants du système immunitaire (revue dans Munoz-Cruz et al., 2011). Cependant, lors de notre expérimentation, les individus supplémentés en testostérone ayant reçu une dose de PHA (antigène provoquant une réponse inflammatoire localisée et mesurable, Josserand et al., 2015, article 1) ne présentent pas un gonflement de la patte moins important que celui des individus témoins. La testostérone ne semble donc pas avoir d'effet immunosuppresseur sur la réaction inflammatoire de la rainette arboricole. Nous ne sommes pas les seuls à obtenir de tels résultats. Par exemple, dans une expérimentation sur des mouettes rieuses (*Larus ridibundus*) captives, Ros et al. (1997) n'ont pas trouvé d'effet de la testostérone sur la production d'anticorps. Par ailleurs, alors que la testostérone est sensée diminuer les capacités de réponse immunitaire et augmenter les risques d'infection des individus, les infections par les parasites ne sont pas systématiquement testostérone-dépendantes (Oppliger et al., 2004 ; Fuxjager et al., 2011).

Cependant, l'absence d'une réponse mesurée de l'effet immunosuppresseur de la testostérone ne signifie pas l'absence de toute réponse. Les études ne sont pas toutes comparables étant donné le fait que certaines utilisent des mesures indirectes de la fonction immunitaire comme la charge parasitaire alors que d'autres sont des mesures directes comme le nombre de lymphocytes ou la réponse inflammatoire. Martin et al. (2008) critiquent la grande majorité des études qui reposent généralement sur un ou quelques tests pour évaluer la fonction immunitaire. En effet, chez les vertébrés, le système immunitaire est complexe et consiste en de nombreuses et diverses interactions entre les cellules, les tissus et les protéines circulantes. Dans notre cas, nous n'avons testé que la réponse inflammatoire du système immunitaire chez *H. arborea*. Martin et al. (2008) recommandent aux immunologistes écologiques de conceptualiser la fonction immunitaire comme étant séparable en plusieurs composantes de défenses disponibles pour les animaux. Cela permettrait de mieux élucider le type particulier de la fonction immunitaire sur laquelle la testostérone pourrait agir. Une

hypothèse alternative pouvant expliquer le fait que nous ne trouvons pas d'effet immunosuppresseur de la testostérone est l'hypothèse de redistribution proposée par Braude et al. en 1999. Les compromis entre la fonction de reproduction et la fonction du système immunitaire peuvent être dus à une réallocation des acteurs du système immunitaire lui-même. Selon cette hypothèse, les leucocytes seraient temporairement détournés en périphérie des ganglions lymphatiques ou de la moelle osseuse en réponse à la testostérone (Braude et al., 1999). Cela permettrait aux acteurs du système immunitaire de continuer leurs actions malgré l'effet immunosuppresseur de la testostérone. Selon ces auteurs, cette immuno-redistribution se confondrait facilement avec un effet immunosuppresseur si les capacités immunitaires sont mesurées par un comptage cellulaire ou si la mesure de l'immunité est faite seulement une fois dans un seul tissu. Afin de tester cette hypothèse, il faudrait pouvoir accéder à plusieurs types de réponses du système immunitaire chez *H. arborea* alors que nous sommes limités par les méthodes invasives et dangereuses pour un animal de petite taille (Josserand et al., 2015).

Par ailleurs, il est connu que les variations de testostérone peuvent entraîner des variations sur d'autres niveaux hormonaux. En effet, des résultats non-publiés au laboratoire (Josserand M2R) les taux de testostérone et de corticostérone sont positivement corrélés chez *H. arborea*. Cette corrélation est également retrouvée dans d'autres études ((Ketterson et al., 1996 ; Evans et al., 2000 ; Owen-Ashley et al., 2004 ; Klukowski et al., 2011). La corticostérone est une hormone glucocorticoïde sécrétée en réponse à un stress par la stimulation de l'axe adrénno-hypothalamo-hypophysaire. Les effets immunosuppresseurs de la corticostérone ont été testé de nombreuses fois (Fowles et al., 1993 ; Evans et al., 2000 ; Buchanan et al., 2003b; Berger et al., 2005 ). En effet, bien que les glucocorticoïdes peuvent avoir un effet positif à court terme en favorisant l'approvisionnement en glucose afin de répondre aux besoins des muscles, du cerveau et du cœur en réponse à une situation de stress, à plus long terme, les capacités énergétiques de l'organisme s'épuisent et la fonction immunitaire est diminuée. Il est connu qu'une exposition chronique à la corticostérone entraîne une diminution de la fonction immunitaire et de la réponse inflammatoire chez les vertébrés (Roberts et al., 2009b). Plusieurs études employant des bloqueurs moléculaires pharmacologiques ont montré que la corticostérone et la testostérone pouvaient utiliser les mêmes récepteurs hormonaux (Breuner et al., 2000 ; Deviche et al., 2001). Plusieurs études ont alors supposé que l'effet immunosuppresseur de la testostérone s'expliquerait de façon indirecte par l'action immunosuppressive de la corticostérone (Møller, 1995 ; Owen-Ashley et al., 2004 ; Roberts et al., 2009a ; Roberts et al., 2009b ; Moore et al., 2011). L'effet immunosuppresseur lié à l'élévation de la testostérone pourrait s'expliquer de façon indirecte



par l'augmentation des taux de corticostérone. Or, dans notre expérimentation, nous n'avons pas manipulé ou contrôlé les taux de corticostérone pour pouvoir répondre à cette hypothèse.

De plus, nos résultats montrent de manière surprenante un effet immuno-stimulant de la testostérone chez les gros mâles qui, contrairement aux individus témoins ou aux petits mâles supplémentés, présentent un gonflement de la patte plus important pouvant être traduit comme une réponse immunitaire inflammatoire plus efficace. Cet effet immuno-stimulant de la testostérone se retrouve également chez le hamster de Sibérie (*Phodopus sungorus*) lors d'une expérimentation *in vitro* (Bilbo et Nelson, 2001). Plusieurs études observent ce phénomène lors d'expérimentations sur la manipulation hormonale chez les oiseaux (Evans et al., 2000 ; McGraw et Ardia, 2007). Evans et al. (2000) ont montré que la testostérone pouvait augmenter la capacité des oiseaux à produire des anticorps. La principale explication donnée par Evans et al. (2000) pour expliquer l'immuno-stimulation de la testostérone était son rôle dans l'augmentation du comportement agressif et de dominance des individus. De ce fait, elle permettait d'augmenter l'accès à la nourriture et par conséquent, à plus de ressources utilisables pour améliorer le système immunitaire. Dans notre expérimentation, nous observons une immuno-stimulation uniquement chez les mâles les plus gros. L'hypothèse proposée par Evans et al., pourrait être recevable dans notre cas si nous supposons que les gros mâles de notre expérimentation le sont grâce à une meilleure acquisition des ressources sur le terrain. Cependant, nous n'avons pas de moyen de le vérifier et au cours de notre expérimentation tous les individus ont été nourris de manière contrôlée et n'ont pas la possibilité d'adapter leur régime alimentaire. En revanche, nos résultats montrent qu'avec un apport nutritionnel équivalent, les mâles supplémentés en testostérone ont un meilleur fonctionnement mitochondrial permettant de réduire les pertes énergétiques inutiles. L'énergie produite peut alors être allouée à différentes fonctions comme l'immunité augmentant la *fitness* ou la survie des individus.

## **VI/ Communication multimodale et étude multimodale**

Dans cette thèse je me suis appliquée à étudier les deux signaux sexuels émis par le mâle de manière concomitante pour étudier l'ICHH dans un contexte de multimodalité. Lors de l'énoncé de l'hypothèse de l'ICHH en 1992, Folstad et Karter proposent un mécanisme universel modulé par la testostérone pour expliquer l'honnêteté des signaux sexuels émis par les mâles au moment de la saison de reproduction. La première hypothèse tient à ce que les signaux sexuels secondaires émis par les mâles soient testostérone-dépendants. Cependant les études traitant l'effet de la testostérone dans le cadre de l'ICHH ne testent souvent qu'une seule modalité sensorielle. Nos résultats montrent que les deux modalités sensorielles

(acoustique et visuelle) des signaux sexuels sont sous la même influence hormonale. Ce qui nous amène à nous interroger sur le rôle de multimodalité dans la communication chez cette espèce. Afin de comprendre l'évolution de la communication multimodale, les chercheurs ont dû comparer les réponses des animaux à un seul composant d'un signal complexe par rapport aux réponses observées face à un mélange aléatoire des autres composants du signal (Candolin, 2003 ; Hebets et Papaj, 2005 ; Partan et Marler, 2005). En fonction de la réponse du récepteur obtenue pour chaque signal, les chercheurs ont pu analyser deux types de signaux. Ceux dont l'expression varie en fonction de la qualité du mâle indiqueraient une redondance alors que les autres transporteraient une information complémentaire (Candolin, 2003 ; Partan et Marler, 2005). La force évolutive de ces signaux peut être affectée par l'environnement dans lequel se propage le signal - altérant le signal et sa valeur pour le récepteur - ou par les comportements de triche de certains individus. Les théoriciens de l'évolution ont souligné plusieurs conditions selon lesquelles la communication multimodale est plus susceptible d'évoluer. Premièrement, les signaux portant des informations similaires (*backup signal hypothesis*) sont plus susceptibles de persister dans le temps quand l'information portée entre l'émetteur et le récepteur est légèrement différente (exemple : les différents aspects de la qualité des mâles, Johnstone, 1996). Par conséquent, la transmission d'informations similaires par des modalités différentes permet de réduire les interférences de l'environnement et le risque d'un partenariat non avantageux. Deuxièmement, les signaux multiples sont évolutivement stables lorsque le coût de production ou de perception de l'ensemble des signaux est faible (Iwasa et Pomiankowski, 1994).

Chez *H. arborea*, bien que l'expression des signaux sexuels soit modulée par la testostérone quelle que soit la modalité sensorielle, l'information portée par chaque composante des signaux n'est pas tout à fait la même. Les paramètres de chant et de coloration sont faiblement corrélés au sein d'un individu (Gomez et al., 2011). Cela implique que ces traits sont susceptibles de véhiculer différentes informations sur l'identité ou la qualité de l'émetteur, soutenant ainsi l'hypothèse de complémentarité des messages. Tout d'abord, d'après l'hypothèse du compromis d'efficacité des signaux (Hebets et Papaj, 2005) nous pouvons supposer que les signaux ne sont pas utilisés de la même façon selon l'échelle spatiale, les chants étant détectables à plus longue distance que la couleur. De plus, l'âge et la condition corporelle des mâles sont portés par la fréquence principale d'émission des chants (Richardson et al., 2010b ; Gomez et al., 2011) alors que la couleur du sac vocal, liée à la présence de caroténoïdes (Richardson et al., 2010 ; rapport 4) pourrait être un indicateur de la condition sanitaire des mâles.

En revanche, nos résultats ne nous permettent pas de savoir si les deux modalités traduisent le potentiel immunitaire global de l'animal et sont l'information commune véhiculée par les deux types de signaux, acoustique et visuel. En effet, bien que nos résultats soient en mesure de valider la première hypothèse de l'ICHH (les signaux sexuels sont testostérone-dépendants), nous n'observons pas d'effet immunosuppresseur de la testostérone pouvant valider l'ICHH. L'ensemble de nos résultats ne coïncident pas avec l'hypothèse selon laquelle la testostérone est le médiateur de l'honnêteté du signal, puisque nous n'avons pas mesuré de coût immunitaire associé à l'utilisation de la testostérone pour l'expression des signaux sexuels.

## **PERSPECTIVES**

### **I/ L'ICHH modulée par le stress ?**

En testant les différentes hypothèses de l'ICHH, nous avons mis en évidence que la testostérone n'a pas d'effet immunosuppresseur sur la réponse immunitaire inflammatoire chez *H. arborea*. Tel que nous l'avons testé, nous ne pouvons pas valider l'ICHH sur notre modèle biologique. Plusieurs études arrivent à la même conclusion chez d'autres espèces (Buchanan et al., 2003a ; Huyghe et al., 2009). Quand Folstad et Karter (1992) ont suggéré que la testostérone était immunosuppressive, ils ont aussi conclu que d'autres substances biologiques actives pouvaient moduler l'ICHH de manière indirecte. Comme présenté dans la partie V de la discussion de cette thèse, sachant que les taux de testostérone sont corrélés avec les taux circulants de corticostérone et que les deux hormones sont capables de se fixer sur le même récepteur cellulaire, l'effet immunosuppresseur de la testostérone pourrait-être une conséquence indirecte de l'augmentation de la corticostérone (Møller, 1995).

Chez *H. arborea*, il serait intéressant de tester l'immunosuppression de la corticostérone chez les mâles au moment de la saison de reproduction afin de comprendre l'interaction des deux hormones sur la réponse immunitaire. Pour ce faire, il faudrait dans un premier temps vérifier *in natura* que les individus ayant les plus forts taux de testostérone présentent également un niveau élevé de corticostérone. Ensuite, nous pourrions mettre en place des expérimentations permettant de contrôler les effets des variations de corticostérone en fonction des taux de testostérone sur la réponse immunitaire.

Bien qu'il existe de plus en plus d'évidences pour expliquer le rôle de la corticostérone en relation avec la testostérone et la réponse immunitaire, elle ne peut cependant complètement valider le mécanisme proposé par l'ICHH. Par exemple, les deux hormones améliorent la réponse des anticorps quand les taux de l'une ou l'autre sont hauts chez le diamant mandarin (*T. guttata*, Roberts et al., 2009a) mais aucune des deux n'influence la

fonction immunitaire chez la caille japonaise (*Coturnix japonica*, Roberts et al., 2007). Ce qui suggère que le mécanisme par lequel les deux hormones interagissent pour modifier la réponse immunitaire est plus complexe que la simple covariance entre les espèces (Moore et al., 2011). Les modèles des relations entre la corticostérone, la testostérone, la réponse immunitaire et l'expression des traits sexuels laissent penser qu'ils représentent des réponses adaptatives aux histoires de vie spécifiques à chaque espèce (Evans, 2010). La recherche de ces relations chez différentes espèces et dans différents contextes est nécessaire pour déterminer le mécanisme par lequel les hormones de stress influencent la réponse immunitaire et l'expression des traits sexuels de manière à développer un modèle plus vraisemblable de la sélection sexuelle affectée par les hormones.

## **II/ La coloration du sac vocal, indice fiable de l'état sanitaire du mâle ?**

La couleur du sac vocal des mâles *H. arborea* est en partie liée à la présence de caroténoïdes. De par la fonction des caroténoïdes dans le système immunitaire, de nombreuses études suggèrent un compromis d'allocation des caroténoïdes avec la fonction ornementale (Alonzo-Alvarez et al., 2008 ; Baeta et al., 2008 ; Bonato et al., 2009). L'information portée par le signal visuel serait relative à la condition sanitaire des mâles. D'ailleurs, certaines études ont observé des relations entre le signal visuel et la réponse immunitaire ou la charge parasitaire (Faivre et al., 2003 ; revue par Simons et al., 2012).

En revanche, chez *H. arborea* la couleur du sac vocal n'est pas un indicateur de la capacité de réponse immunitaire du mâle (données non publiées). De plus, lors de la mesure de la réponse immunitaire chez mâles *H. arborea* en 2013 (Desprat et al., 2015, article 2), nous avons remarqué une diminution de la couleur du sac vocal après 3 jours (données non publiées). Ce résultat pourrait exprimer la réallocation des caroténoïdes du sac vocal au profit de la fonction immunitaire pour permettre aux mâles de répondre au challenge immunitaire. Cependant, il nous est impossible de conclure avec certitude si la diminution de la couleur du sac vocal observée était due uniquement à l'injection de PHA et non à d'autres facteurs extérieurs comme la condition du mâle ou le stress du maintien en captivité.

Dans une future expérimentation il serait possible de répondre à cette question en étudiant les variations de la couleur du sac vocal suite à un choc immunitaire en tenant compte du régime alimentaire. En effet, l'immuno-stimulation des mâles supplémentés en testostérone n'a été observé que chez les plus gros, supposant un lien avec la condition corporelle des individus dans la capacité de réponse immunitaire. Au moment de la reproduction, la femelle peut être exposée à un risque de contamination parasitaire au moment de l'amplexus (Able, 1996). Le choix d'un partenaire en bonne santé peut alors lui apporter

des bénéfices directs même dans un système de type lek où la contribution des mâles ne consiste qu'en leur sperme. Dans ce contexte, nous pouvons faire l'hypothèse que la couleur du sac vocal - signal sexuel utilisé par les femelles pour sélectionner leur partenaire (Gomez et al., 2009) - serait un indicateur fiable de l'état sanitaire du mâle au moment présent ou d'une infection relativement récente.

### **III/ La variabilité du choix femelle, quel est le rôle des hormones ?**

Tout le travail de cette thèse porte sur l'effet des stéroïdes, principalement la testostérone, sur la production des signaux sexuels chez les mâles *H. arborea*, i.e. sur l'émetteur du signal dans la communication intra-spécifique. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'effet des hormones stéroïdes sur la femelle, c'est-à-dire le récepteur du signal dans la communication inter-sexuelle. Les femelles *H. arborea* ont montré une préférence significative pour des chants émis avec une forte amplitude, une vitesse élevée, une fréquence dominante faible et de façon plus marginale pour des bouts de chant plus long (Richardson et al., 2010b). Le choix de la femelle est aussi basé sur un sac vocal sombre et saturé en couleur (paramètres de clarté et de chroma, Gomez et al., 2009). Lorsqu'il est proposé aux femelles des choix entre les combinaisons acoustiques et visuelles de qualité variable (Richardson et al., 2010a), les femelles choisissent préférentiellement l'association « bons chants » et « bonne couleur » (chants graves, rapides et forts, associés à un sac vocal d'une couleur intense et foncée) par rapport à un signal peu attractif pour les deux types de composante. En revanche, face à des informations acoustiques et visuelles conflictuelles, les préférences des femelles sont partagées à égale proportion (Richardson et al., 2010a). Ce résultat indique que la prise compte d'une modalité sensorielle supplémentaire dans le choix du partenaire peut totalement modifier l'issue de la sélection sexuelle prédite par des tests uni-modaux. Ce résultat souligne également l'existence potentielle d'une variabilité individuelle des femelles dans la priorisation des signaux acoustiques et visuels émis par le mâle (Richardson et al., 2010a).

Dans la plupart des études, les variations inter-individuelles dans le choix des femelles ont souvent été attribuées à du bruit de fond inhérent aux expérimentations (Gomez et al., 2010 ; Richardson et al., 2010b ; Troïanowski et al., 2014). Or ces différences peuvent résulter d'une modification des règles de choix de la femelle au cours du temps. La femelle deviendrait moins sélective avec l'approche du moment de la ponte (« trouver un mâle » plutôt que « sélectionner le meilleur mâle »). À ce titre, la prise en compte des profils hormonaux de la femelle au moment du choix du partenaire pourrait être un élément clef.

Quelques rares études ont commencé à travailler sur le rôle des hormones sur le comportement de la femelle lors du choix du partenaire au moment de la saison de reproduction chez les anoues. Par exemple, les études sur la femelle tungara (*Physalaemus pustulosus*) ont démontré que la réceptivité maximale (i.e. une réponse phonotactique positive à n'importe quel mâle) et la permissivité (sélectivité phonotactique évaluée par la réponse à un chant synthétique connu pour être de moins bonne qualité que le chant d'un bon mâle) correspondent aux pics de teneur en œstrogène et progestérone circulante (Lynch et Wilczynski, 2005). Ces résultats suggèrent que les fluctuations d'œstradiol sont responsables des principaux changements de comportement reproducteurs chez la femelle au cours d'un cycle hormonal.

Si la variation de la sélectivité des femelles réceptives en fonction du cycle hormonal est mise en évidence, alors ce mécanisme permettrait aux mâles de moins bonne qualité de pouvoir accéder à la reproduction et aussi de transmettre une partie de leur génome à leur descendance. Ce phénomène permettrait ainsi d'augmenter la variabilité génétique de la population regroupée en lek.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Able D.J. (1996). The contagion indicator hypothesis for parasite-mediated sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2229-2233.
- Abrahams M.V. (1993). The trade-off between foraging and courting in male guppies. *Animal Behaviour*, 45, 673-681.
- Ågmo A. (1999). Sexual motivation - An inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 105, 129-150.
- Alonso-Alvarez C., Bertrand S., Devevey G., Gaillard M., Prost J., Faivre B. & Sorci G. (2004). An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *American Naturalist*, 164, 651-659.
- Alonso-Alvarez C., Perez-Rodriguez L., Mateo R., Chastel O. & Vinuela J. (2008). The oxidation handicap hypothesis and the carotenoid allocation trade-off. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 1789-1797.
- Amory J.K. & Bremner W.J. (2003). Regulation of testicular function in men : Implications for male hormonal contraceptive development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85, 357-361.
- Andersson M. (1994). *Sexual Selection*. Princeton University Press, Princeton.
- Andersson M. & Iwasa Y. (1996). Sexual selection. *Trends in ecology & evolution*, 11, 53-8.
- Arak A. (1983). Sexual selection by male-male competition in natterjack toad choruses. *Nature*, 306, 261-262.
- Ash C.E. & Merry B.J. (2011). The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132, 43-54.
- Baeta R., Faivre B., Motreuil S., Gaillard M. & Moreau J. (2008). Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display : An experimental study in the blackbird (*Turdus merula*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 275, 427-434.
- Bailey N.W., Gray B. & Zuk M. (2010). Acoustic experience shapes alternative mating tactics and reproductive investment in male field crickets. *Current Biology*, 20, 845-849.
- Beani L., Panzica G., Briganti F., Persichella P. & Dessifulgheri F. (1995). Testosterone-induced changes of call structure, midbrain and syrinx anatomy in partridges. *Physiology & Behavior*, 58, 1149-1157.



- Bednekoff P.A. (1996). Risk-sensitive foraging, fitness, and life histories : Where does reproduction fit into the big picture ? *American Zoologist*, 36, 471-483.
- Belovsky G.E., Slade J.B. & Chase J.M. (1996). Mating strategies based on foraging ability : An experiment with grasshoppers. *Behavioral Ecology*, 7, 438-444.
- Berger S., Martin L.B., Wikelski M., Romero L.M., Kalko E.K.V., Vitousek M.N. & Rodl T. (2005). Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Hormones and Behavior*, 47, 419-429.
- Bernal X.E., Page R.A., Ryan M.J., Argo T.F. & Wilson P.S. (2009). Acoustic radiation patterns of mating calls of the tungara frog (*Physalaemus pustulosus*) : Implications for multiple receivers. *Journal of the Acoustical Society of America*, 126, 2757-2767.
- Bevier C.R. (1997). Utilization of energy substrates during calling activity in tropical frogs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41, 343-352.
- Bilbo S.D. & Nelson R.J. (2001). Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian hamsters. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280, 207-213.
- Blanckenhorn W.U., Preziosi R.F. & Fairbairn D.J. (1995). Time and energy constraints and the evolution of sexual size dimorphism - To eat or to mate. *Evolutionary Ecology*, 9, 369-381.
- Blas J., Perez-Rodriguez L., Bortolotti G.R., Vinuela J. & Marchant T.A. (2006). Testosterone increases bioavailability of carotenoids : Insights into the honesty of sexual signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 18633-18637.
- Bonato M., Evans M.R., Hasselquist D. & Cherry M.I. (2009). Male coloration reveals different components of immunocompetence in ostriches, *Struthio camelus*. *Animal Behaviour*, 77, 1033-1039.
- Bonnet X., Naulleau G., Shine R. & Lourdaïs O. (2001). Short-term versus long-term effects of food intake on reproductive output in a viviparous snake, *Vipera aspis*. *Oikos*, 92, 297-308.
- Boogert N.J., Bui C., Howarth K., Giraldeau L.A. & Lefebvre L. (2010). Does foraging behaviour affect female mate preferences and pair formation in captive zebra finches ? *Plos One*, 5, 14.
- Boughton R.K., Joop G. & Armitage S.A.O. (2011). Outdoor immunology : Methodological considerations for ecologists. *Functional Ecology*, 25, 81-100.
- Bradbury J.W. (1981). The evolution of leks. In: *Natural selection and social behavior*. Chiron Press, New York.

- Bradshaw D. (2007). Environmental endocrinology. *General and Comparative Endocrinology*, 152, 125-141.
- Brantley R.K., Marchaterre M.A. & Bass A.H. (1993). Androgen effects on vocal muscle structure in a teleost fish with inter- and intra- sexual dimorphism *Journal of Morphology*, 216, 305-318.
- Braude S., Tang-Martinez Z. & Taylor G.T. (1999). Stress, testosterone, and the immunoredistribution hypothesis. *Behavioral Ecology*, 10, 345-350.
- Brecht M. & Freiwald W.A. (2012). The many facets of facial interactions in mammals. *Current Opinion in Neurobiology*, 22, 259-266.
- Brepson L., Voituron Y. & Lengagne T. (2013). Condition-dependent ways to manage acoustic signals under energetic constraint in a tree frog. *Behavioral Ecology*, 24, 488-496.
- Breuner C.W. & Wingfield J.C. (2000). Rapid behavioral response to corticosterone varies with photoperiod and dose. *Hormones and Behavior*, 37, 23-30.
- Briggs V.S. (2010). Call trait variation in morelett's tree frog, *agalychnis moreletii*, of belize. *Herpetologica*, 66, 241-249.
- Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal*, 9, 1551-1558.
- Brooks D.E. (1979). Influence of androgens on the weights of the male accessory reproductive-organs and on the activities of mitochondrial-enzymes in the epididymis of the rat. *Journal of Endocrinology*, 82, 293-303.
- Buchanan K.L., Evans M.R. & Goldsmith A.R. (2003a). Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, 50-59.
- Buchanan K.L., Spencer K.A., Goldsmith A.R. & Catchpole C.K. (2003b). Song as an honest signal of past developmental stress in the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 1149-1156.
- Byers B.E. & Kroodsma D.E. (2009). Female mate choice and songbird song repertoires. *Animal Behaviour*, 77, 13-22.
- Candolin U. (2003). The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews*, 78, 575-595.
- Casagrande S., Costantini D., Fanfani A., Tagliavini J. & Dell'Omo G. (2007). Patterns of serum carotenoid accumulation and skin colour variation in kestrel nestlings in relation to breeding conditions and different terms of carotenoid supplementation.

- Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 177, 237-245.
- Castellano S. (2009). Towards an information-processing theory of mate choice. *Animal Behaviour*, 78, 1493-1497.
- Charlton B.D., Reby D. & McComb K. (2007). Female red deer prefer the roars of larger males. *Biology Letters*, 3, 382-385.
- Chavez-Zichinelli C.A., Gomez L., Ortiz-Pulido R., Lara C., Valdez R. & Romano M.C. (2014). Testosterone levels in feces predict risk-sensitive foraging in hummingbirds. *Journal of Avian Biology*, 45, 501-506.
- Cherry M.I. (1993). Sexual selection in the raucous toad, *Bufo rangeri*. *Animal Behaviour*, 45, 359-373.
- Clairardin S.G., Barnett C.A., Sakaluk S.K. & Thompson C.F. (2011). Experimentally increased *in ovo* testosterone leads to increased plasma bactericidal activity and decreased cutaneous immune response in nestling house wrens. *Journal of Experimental Biology*, 214, 2778-2782.
- Costantini D., Coluzza C., Fanfani A. & Dell'Omo G. (2007). Effects of carotenoid supplementation on colour expression, oxidative stress and body mass in rehabilitated captive adult kestrels (*Falco tinnunculus*). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 177, 723-731.
- Cox R.M., Skelly S.L., Leo A. & John-Alder H.B. (2005). Testosterone regulates sexually dimorphic coloration in the Eastern fence lizard, *Sceloporus undulatus*. *Copeia*, 597-608.
- Cucco M., Guasco B., Malacarne G. & Ottonelli R. (2006). Effects of beta-carotene supplementation on chick growth, immune status and behaviour in the grey partridge, *Perdix perdix*. *Behavioural Processes*, 73, 325-332.
- Darwin C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection*. Murray, London.
- Darwin C. (1871). *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. Murray, London.
- Desprat J.L., Lengagne T., Dumet A., Desouhant E. & Mondy N. (2015). Immunocompetence handicap hypothesis in tree frog : Trade-off between sexual signals and immunity ? *Behavioral Ecology* 26, 1138-1146.
- Deviche P., Breuner C. & Orchinik M. (2001). Testosterone, corticosterone, and photoperiod interact to regulate plasma levels of binding globulin and free steroid hormone in dark-eyed juncos, *Junco hyemalis*. *General and Comparative Endocrinology*, 122, 67-77.
- Dowling D.K. & Simmons L.W. (2009). Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 276, 1737-1745.

- Eberhard W.G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, Princeton.
- Edler R., Goymann W., Schwabl I. & Friedl T.W.P. (2011). Experimentally elevated testosterone levels enhance courtship behaviour and territoriality but depress acquired immune response in red bishops *Euplectes orix*. *Ibis*, 153, 46-58.
- Egginton S. (1987). Effects of an anabolic hormone on striated-muscle growth and performance. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 410, 349-355.
- Emerson S.B. & Hess D.L. (2001). Glucocorticoids, androgens, testis mass, and the energetics of vocalization in breeding male frogs. *Hormones and Behavior*, 39, 59-69.
- Evans M.R. (2010). Why does testosterone influence morphology, behaviour and physiology ? *Open Ornithol. J.*, 6, 21-26.
- Evans M.R., Goldsmith A.R. & Norris S.R.A. (2000). The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47, 156-163.
- Evans S., Neave N., Wakelin D. & Hamilton C. (2008). The relationship between testosterone and vocal frequencies in human males. *Physiology & Behavior*, 93, 783-788.
- Faivre B., Gregoire A., Preault M., Cezilly F. & Sorci G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science*, 300, 103-103.
- Fargallo J.A., Martinez-Padilla J., Toledano-Diaz A., Santiago-Moreno J. & Davila J.A. (2007). Sex and testosterone effects on growth, immunity and melanin coloration of nestling Eurasian kestrels. *Journal of Animal Ecology*, 76, 201-209.
- Folstad I. & Karter A.J. (1992). Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist*, 139, 603-622.
- Folstad I. & Skarstein P. (1997). Is male germ line control creating avenues for female choice ? *Behavioral Ecology*, 8, 109-112.
- Fongy A., Romestaing C., Blanc C., Lacoste-Garanger N., Rouanet J.-L., Raccurt M. & Duchamp C. (2013). Ontogeny of muscle bioenergetics in Adelie penguin chicks (*Pygoscelis adeliae*). *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 305, R1065-R1075.
- Fowles J.R., Fairbrother A., Fix M., Schiller S. & Kerkvliet N.I. (1993). Glucocorticoid effects on natural and humoral immunity in mallards. *Developmental and Comparative Immunology*, 17, 165-177.
- Friedl T.W.P. & Klump G.M. (1997). Some aspects of population biology in the European treefrog, *Hyla arborea*. *Herpetologica*, 53, 321-330.

- Friedl T.W.P. & Klump G.M. (2005). Sexual selection in the lek-breeding European treefrog : Body size, chorus attendance, random mating and good genes. *Animal Behaviour*, 70, 1141-1154.
- Fusani L. (2008). Testosterone control of male courtship in birds. *Hormones and Behavior*, 54, 227-233.
- Fusani L., Beani L., Lupo C. & DessiFulgheri F. (1997). Sexually selected vigilance behaviour of the grey partridge is affected by plasma androgen levels. *Animal Behaviour*, 54, 1013-1018.
- Fuxjager M.J., Foufopoulos J., Diaz-Uriarte R. & Marler C.A. (2011). Functionally opposing effects of testosterone on two different types of parasite : Implications for the immunocompetence handicap hypothesis. *Functional Ecology*, 25, 132-138.
- Galeotti P., Saino N., Sacchi R. & Moller A.P. (1997). Song correlates with social context, testosterone and body condition in male barn swallows. *Animal Behaviour*, 53, 687-700.
- Getty T. (1998a). Handicap signalling : when fecundity and viability do not add up. *Animal Behaviour*, 56, 127-130.
- Getty T. (1998b). Reliable signalling need not be a handicap - Commentary. *Animal Behaviour*, 56, 253-255.
- Gillooly J.F. & Ophir A.G. (2010). The energetic basis of acoustic communication. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, pp. -.
- Girgenrath M. & Marsh R.L. (1997). In vivo performance of trunk muscles in tree frogs during calling. *Journal of Experimental Biology*, 200, 3101-3108.
- Girgenrath M. & Marsh R.L. (2003). Season and testosterone affect contractile properties of fast calling muscles in the gray tree frog *Hyla chrysoscelis*. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 284, 1513-1520.
- Gomez D., Richardson C., Lengagne T., Derex M., Plenet S., Joly P., Lena J.P. & Thery M. (2010). Support for a role of colour vision in mate choice in the nocturnal European treefrog (*Hyla arborea*). *Behaviour*, 147, 1753-1768.
- Gomez D., Richardson C., Lengagne T., Plenet S., Joly P., Lena J.P. & Thery M. (2009). The role of nocturnal vision in mate choice : Females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 276, 2351-2358.
- Gomez D., Richardson C., Thery M., Lengagne T., Lena J.P., Plenet S. & Joly P. (2011). Multimodal signals in male European treefrog (*Hyla arborea*) and the influence of population isolation on signal expression. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 633-647.

- Gordon S.D. & Uetz G.W. (2011). Multimodal communication of wolf spiders on different substrates : Evidence for behavioural plasticity. *Animal Behaviour*, 81, 367-375.
- Gould L. & Ziegler T.E. (2007). Variation in fecal testosterone levels, inter-male aggression, dominance rank and age during mating and post-mating periods in wild adult male ring-tailed Lemurs (*Lemur catta*). *American Journal of Primatology*, 69, 1325-1339.
- Grafe T.U. (1996). Energetics of vocalization in the African reed frog (*Hyperolius marmoratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, 114, 235-243.
- Grafe T.U. & Thein J. (2001). Energetics of calling and metabolic substrate use during prolonged exercise in the European treefrog *Hyla arborea*. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 171, 69-76.
- Grafen A. (1990b). Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology*, 144, 517-546.
- Green A.J. (1990). Determinant of chorus participation and the effect of size, weight and competition on advertisement calling in the tungara frog, *Physalaemus pustulosus* (*Leptodactylidae*). *Animal Behaviour*, 39, 620-638.
- Grether G.F. (2000). Carotenoid limitation and mate preference evolution : A test of the indicator hypothesis in guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution*, 54, 1712-1724.
- Grether G.F., Cummings M.E., Hudon J. & Rowe L. (2005). Countergradient variation in the sexual coloration of guppies (*Poecilia reticulata*) : Drosoperin synthesis balances carotenoid availability. *Evolution*, 59, 175-188.
- Grether G.F., Hudon J. & Endler J.A. (2001). Carotenoid scarcity, synthetic pteridine pigments and the evolution of sexual coloration in guppies (*Poecilia reticulata*). *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 268, 1245-1253.
- Gridi-Papp M. (2008). The structure of vocal sounds produced with the mouth closed or with the mouth open in treefrogs. *Journal of the Acoustical Society of America*, 123, 2895-2902.
- Guilford T. & Dawkins M.S. (1991). Receiver psychology and the evolution of animal signals. *Animal Behaviour*, 42, 1-14.
- Gwynne D.T. (1993). Food quality controls sexual selection in mormon crickets by altering male mating investment. *Ecology*, 74, 1406-1413.
- Hamilton W.D. & Zuk M. (1982). Heritable true fitness and bright birds - A role for parasites. *Science*, 218, 384-387.
- Hebets E.A. & Papaj D.R. (2005). Complex signal function : Developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 197-214.



- Heng T.S.P., Goldberg G.L., Gray D.H.D., Sutherland J.S., Chidgey A.P. & Boyd R.L. (2005). Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *Journal of Immunology*, 175, 2982-2993.
- Hennicke J.C. & Culik B.M. (2005). Foraging performance and reproductive success of Humboldt penguins in relation to prey availability. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 173-181.
- Hermann C.M., Brudermann V., Zimmermann H., Vollmann J. & Sefc K.M. (2015). Female preferences for male traits and territory characteristics in the cichlid fish *Tropheus moorii*. *Hydrobiologia*, 748, 61-74.
- Hill G.E. (1991). Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature*, 350, 337-339.
- Holmes M.M., Bartrem C.L. & Wade J. (2007). Androgen dependent seasonal changes in muscle fiber type in the dewlap neuromuscular system of green anoles. *Physiology & Behavior*, 91, 601-608.
- Hsu B.Y., Pu Y.S., Inbaraj B.S. & Chen B.H. (2012). An improved high performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry method for determination of carotenoids and their precursors phytoene and phytofluene in human serum. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 899, 36-45.
- Huber S., Millesi E. & Dittami J.P. (2002). Paternal effort and its relation to mating success in the European ground squirrel. *Animal Behaviour*, 63, 157-164.
- Huyghe K., Husak J.F., Herrel A., Tadic Z., Moore I.T., Van Damme R. & Vanhooydonck B. (2009). Relationships between hormones, physiological performance and immunocompetence in a color-polymorphic lizard species, *Podarcis melisellensis*. *Hormones and Behavior*, 55, 488-494.
- Ilany A., Barocas A., Kam M., Ilany T. & Geffen E. (2013). The energy cost of singing in wild rock hyrax males : Evidence for an index signal. *Animal Behaviour*, 85, 995-1001.
- Iwasa Y. & Pomiankowski A. (1994). The evolution of mate preferences for multiple sexual ornaments. *Evolution*, 48, 853-867.
- Jaquier J., Broquet T., Aguilar C., Evanno G. & Perrin N. (2010). Good genes drive female choice for matind partners in the lek-breeding european treefrog. *Evolution*, 64, 108-115.
- Jaramillo C., Rand A.S., Ibanez R. & Dudley R. (1997). Elastic structures in the vocalization apparatus of the Tungara frog *Physalaemus pustulosus* (Leptodactylidae). *Journal of Morphology*, 233, 287-295.



- Johnstone R.A. (1995). Honest advertisement of multiple qualities using multiple signals. *Journal of Theoretical Biology*, 177, 87-94.
- Johnstone R.A. (1996). Multiple displays in animal communication : 'Backup signals' and 'multiple messages'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 351, 329-338.
- Josserand R., Troïanowski M., Grolet O., Desprat J.L., Lengagne T. & Mondy N. (2015). A phytohaemagglutinin challenge test to assess immune responsiveness of European tree frog. *Amphibia-Reptilia*, 36, 111-118.
- Juola F.A., McGraw K. & Dearborn D.C. (2008). Carotenoids and throat pouch coloration in the great frigatebird (*Fregata minor*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 149, 370-377.
- Karino K., Shinjo S. & Sato A. (2007). Algal-searching ability in laboratory experiments reflects orange spot coloration of the male guppy in the wild. *Behaviour*, 144, 101-113.
- Karino K., Utagawa T. & Shinjo S. (2005). Heritability of the algal-foraging ability : An indirect benefit of female mate preference for males' carotenoid-based coloration in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59, 1-5.
- Karubian J., Lindsay W.R., Schwabl H. & Webster M.S. (2011). Bill coloration, a flexible signal in a tropical passerine bird, is regulated by social environment and androgens. *Animal Behaviour*, 81, 795-800.
- Kayes S.M., Cramp R.L., Hudson N.J. & Franklin C.E. (2009). Surviving the drought : burrowing frogs save energy by increasing mitochondrial coupling. *Journal of Experimental Biology*, 212, 2248-2253.
- Kelley D.B. (2004). Vocal communication in frogs. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 751-757.
- Kemp D.J., Herberstein M.E. & Grether G.F. (2011). Unraveling the true complexity of costly color signaling. *Behavioral Ecology*, 233-236.
- Ketterson E.D., Nolan V., Cawthorn M.J., Parker P.G. & Ziegenfus C. (1996). Phenotypic engineering : Using hormones to explore the mechanistic and functional bases of phenotypic variation in nature. *Ibis*, 138, 70-86.
- Klein S.L., Hairston J.E., DeVries A.C. & Nelson R.J. (1997). Social environment and steroid hormones affect species and sex differences in immune function among voles. *Hormones and Behavior*, 32, 30-39.
- Klemuk S.A., Riede T., Walsh E.J. & Titze I.R. (2011). Adapted to roar : Functional morphology of tiger and lion vocal folds. *Plos One*, 6. DOI : 10.1371/journal.pone.0027029

- Klukowski M. (2011). Effects of breeding season, testosterone and ACTH on the corticosterone response of free-ranging male fence lizards (*Sceloporus undulatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 173, 295-302.
- Kokko H., Jennions M.D. & Brooks R. (2006). Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37, 43-66.
- Koren L. & Geffen E. (2009). Complex call in male rock hyrax (*Procavia capensis*) : A multi-information distributing channel. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63, 581-590.
- Kovacs E.H., Sas I., Covaciu-Marcovl S.D., Hartel T., Cupsa D. & Groza M. (2007). Seasonal variation in the diet of a population of *Hyla arborea* from Romania. *Amphibia-Reptilia*, 28, 485-491.
- Lacreuse A., Gore H.E., Chang J. & Kaplan E.R. (2012). Short-term testosterone manipulations modulate visual recognition memory and some aspects of emotional reactivity in male rhesus monkeys. *Physiology & Behavior*, 106, 229-237.
- Leal M. & Fleishman L.J. (2004). Differences in visual signal design and detectability between allopatric populations of *Anolis* lizards. *American Naturalist*, 163, 26-39.
- Leary C.J. (2009). Hormones and acoustic communication in anuran amphibians. *Integrative and Comparative Biology*, 49, 452-470.
- Leary C.J., Garcia A.M. & Knapp R. (2006). Elevated corticosterone levels elicit non-calling mating tactics in male toads independently of changes in circulating androgens. *Hormones and Behavior*, 49, 425-432.
- Leary C.J., Garcia A.M., Knapp R. & Hawkins D.L. (2008). Relationships among steroid hormone levels, vocal effort and body condition in an explosive-breeding toad. *Animal Behaviour*, 76, 175-185.
- Li L., Qin J., Yin S.-a. & Tang G. (2007). Effects of mobile phase ratios on the separation of plant carotenoids by HPLC with a C30 column. *Chromatographia*, 65, 91-94.
- Lozano G.A. (1994). Carotenoids, parasites, and sexual selection. *Oikos*, 70, 309-311.
- Lutz G.J. & Lieber R.L. (2000). Myosin isoforms in anuran skeletal muscle : Their influence on contractile properties and in vivo muscle function. *Microscopy Research and Technique*, 50, 443-457.
- Lynch K.S. & Wilczynski W. (2005). Gonadal steroids vary with reproductive stage in a tropically breeding female anuran. *General and Comparative Endocrinology*, 143, 51-56.
- MacNally R.C. (1981). On the reproductive energetics of chorusing males - energy depletion profiles, restoration and growth in 2 sympatric species of *ranidella* (anura). *Oecologia*, 51, 181-188.

- Maddison C.J., Anderson R.C., Prior N.H., Taves M.D. & Soma K.K. (2012). Soft song during aggressive interactions : Seasonal changes and endocrine correlates in song sparrows. *Hormones and Behavior*, 62, 455-463.
- Marler C.A. & Ryan M.J. (1996). Energetic constraints and steroid hormone correlates of male calling behaviour in the tungara frog. *Journal of Zoology*, 240, 397-409.
- Marler P. (1977). The evolution of communication. In: *How animals communicate*. Indiana University Press, Bloomington.
- Marsh R.L. & Taigen T.L. (1987). Properties enhancing aerobic capacity of calling muscles in gray tree frogs *Hyla versicolor*. *American Journal of Physiology*, 252, 786-793.
- Martin L.B., Weil Z.M. & Nelson R.J. (2008). Seasonal changes in vertebrate immune activity : mediation by physiological trade-offs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 363, 321-339.
- McGraw K.J. (2005). The antioxidant function of many animal pigments : Are there consistent health benefits of sexually selected colourants ? *Animal Behaviour*, 69, 757-764.
- McGraw K.J. & Ardia D.R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors : An experimental test. *American Naturalist*, 162, 704-712.
- McGraw K.J. & Ardia D.R. (2005). Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. *Evolutionary Ecology Research*, 7, 251-262.
- McGraw K.J. & Ardia D.R. (2007). Do carotenoids buffer testosterone-induced immunosuppression ? An experimental test in a colourful songbird. *Biology Letters*, 3, 375-378.
- McGraw K.J. & Hill G.E. (2001). Carotenoid access and intraspecific variation in plumage pigmentation in male American Goldfinches (*Carduelis tristis*) and Northern Cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Functional Ecology*, 15, 732-739.
- McGraw K.J., Hill G.E. & Parker R.S. (2005). The physiological costs of being colourful : Nutritional control of carotenoid utilization in the American goldfinch, *Carduelis tristis*. *Animal Behaviour*, 69, 653-660.
- McLister J.D. (2001). Physical factors affecting the cost and efficiency of sound production in the treefrog *Hyla versicolor*. *Journal of Experimental Biology*, 204, 69-80.
- Meuche I. & Grafe T.U. (2009). Supplementary feeding affects the breeding behaviour of male European treefrogs (*Hyla arborea*). *BMC Ecology*, 9.
- Møller A.P. (1995). Hormones, handicaps and bright birds. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, 121-121.

- Moore F.R., Cornwell R.E., Smith M.J.L., Al Dujaili E.A.S., Sharp M. & Perrett D.I. (2011). Evidence for the stress-linked immunocompetence handicap hypothesis in human male faces. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 278, 774-780.
- Mougeot F. (2008). Ornamental comb colour predicts T-cell-mediated immunity in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Naturwissenschaften*, 95, 125-132.
- Mougeot F., Dawson A., Redpath S.M. & Leckie F. (2005). Testosterone and autumn territorial behavior in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Hormones and Behavior*, 47, 576-584.
- Müller K., Koster S., Painer J., Soderberg A., Gavier-Widen D., Brunner E., Dehnhard M. & Jewgenow K. (2014). Testosterone production and spermatogenesis in free-ranging Eurasian lynx (*Lynx lynx*) throughout the year. *European Journal of Wildlife Research*, 60, 569-577.
- Munoz-Cruz S., Togno-Pierce C. & Morales-Montor J. (2011). Non-reproductive effects of sex steroids : Their immunoregulatory role. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 1714-1727.
- Murphy C.G. (1994). Determinants of chorus tenure in barking treefrogs (*Hyla gratiosa*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34, 285-294.
- Nagesser A.S., Vanderlaarse W.J. & Elzinga G. (1992). Metabolic changes with fatigue in different types of single muscle-fibers of *Xenopus laevis*. *Journal of Physiology-London*, 448, 511-523.
- Neave N. (2008). *Hormones and behaviour : a psychological approach*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nomura R., Kondo M., Tanikawa A., Yamamoto N., Terasaki H. & Miyake Y. (2001). Unilateral cone dysfunction with bull's eye maculopathy. *Ophthalmology*, 108, 49-53.
- O'Loghlen A.L. & Rothstein S.I. (2010b). It's not just the song : Male visual displays enhance female sexual responses to song in brown-headed cowbirds. *Condor*, 112, 615-621.
- Olson V.A. & Owens I.P.F. (1998). Costly sexual signals : Are carotenoids rare, risky or required ? *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 510-514.
- Oppliger A., Giorgi M.S., Conelli A., Nembrini M. & John-Alder H.B. (2004). Effect of testosterone on immunocompetence, parasite load, and metabolism in the common wall lizard (*Podarcis muralis*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 82, 1713-1719.
- Owen-Ashley N.T., Hasselquist D. & Wingfield J.C. (2004). Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis : Unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *American Naturalist*, 164, 490-505.

- Papke R.S., Kemp D.J. & Rutowski R.L. (2007). Multimodal signalling : Structural ultraviolet reflectance predicts male mating success better than pheromones in the butterfly *Colias eurytheme* L. (Pieridae). *Animal Behaviour*, 73, 47-54.
- Parker G.A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 45, 525- &.
- Parker R.S. (1996). Carotenoids part 4. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb Journal*, 10, 542-551.
- Partan S.R. & Marler P. (2005). Issues in the classification of multimodal communication signals. *American Naturalist*, 166, 231-245.
- Pasch B., George A.S., Campbell P. & Phelps S.M. (2011). Androgen-dependent male vocal performance influences female preference in Neotropical singing mice. *Animal Behaviour*, 82, 177-183.
- Pauly G.B., Bernal X.E., Rand A.S. & Ryan M.J. (2006). The vocal sac increases call rate in the tungara frog *Physalaemus pustulosus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79, 708-719.
- Peters A. (2002). Testosterone and the trade-off between mating and paternal effort in extrapair-mating superb fairy-wrens. *Animal Behaviour*, 64, 103-112.
- Pfannkuche K.A., Bouma A. & Groothuis T.G.G. (2009). Does testosterone affect lateralization of brain and behaviour ? A meta- analysis in humans and other animal species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 364, 929-942.
- Pough F.H., Magnusson W.E., Ryan M.J., Wells K.D. & Taigen T.L. (1992). Behavioral energetics. In: *Environmental Physiology of Amphibians*. University of Chicago Press, Chicago.
- Prestwich K.N. (1994). The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *American Zoologist*, 34, 625-643.
- Putnam R.W. & Bennett A.F. (1983). Histochemical, enzymatic, and contractile properties of skeletal-muscles of three anuran amphibians. *American Journal of Physiology*, 244, R558-R567.
- Ressel S.J. (1996). Ultrastructural properties of muscles used for call production in neotropical frogs. *Physiological Zoology*, 69, 952-973.
- Rettew J.A., Huet-Hudson Y.M. & Marriott I. (2008). Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biology of Reproduction*, 78, 432-437.

- Richardson C., Gomez D., Durieux R., Thery M., Joly P., Lena J.P., Plenet S. & Lengagne T. (2010a). Hearing is not necessarily believing in nocturnal anurans. *Biology Letters*, 6, 633-635.
- Richardson C., Joly P., Lena J.P., Plenet S. & Lengagne T. (2010b). The challenge of finding a high-quality male : A treefrog solution based on female assessment of male calls. *Behaviour*, 147, 1737-1752.
- Richardson C. & Lengagne T. (2010). Multiple signals and male spacing affect female preference at cocktail parties in treefrogs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences*, 277, 1247-1252.
- Richardson C., Popovici J., Bellvert F. & Lengagne T. (2009). Conspicuous colouration of the vocal sac of a nocturnal chorusing treefrog : carotenoid-based ? *Amphibia-Reptilia*, 30, 576-580.
- Roberts M.L., Buchanan K.L. & Evans M.R. (2004). Testing the immunocompetence handicap hypothesis : a review of the evidence. *Animal Behaviour*, 68, 227-239.
- Roberts M.L., Buchanan K.L., Evans M.R., Marin R.H. & Satterlee D.G. (2009a). The effects of testosterone on immune function in quail selected for divergent plasma corticosterone response. *Journal of Experimental Biology*, 212, 3125-3131.
- Roberts M.L., Buchanan K.L., Hasselquist D. & Evans M.R. (2007). Effects of testosterone and corticosterone on immunocompetence in the zebra finch. *Hormones and Behavior*, 51, 126-134.
- Roberts M.L., Ras E. & Peters A. (2009b). Testosterone increases UV reflectance of sexually selected crown plumage in male blue tits. *Behavioral Ecology*, 20, 535-541.
- Rodrigues A.S., Lacerda B., Moreno A.J.M. & Ramalho-Santos J. (2010). Proton leak modulation in testicular mitochondria affects reactive oxygen species production and lipid peroxidation. *Cell Biochemistry and Function*, 28, 224-231.
- Ros A.F.H., Groothuis T.G.G. & Apanius V. (1997). The relation among gonadal steroids, immunocompetence, body mass, and behavior in young black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *American Naturalist*, 150, 201-219.
- Rose M.R. & Bradley T.J. (1998). Evolutionary physiology of the cost of reproduction. *Oikos*, 443-451.
- Rowe C. (1999). Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Animal Behaviour*, 58, 921-931.
- Rubinstein N.A., Erulkar S.D. & Schneider G.T. (1983). Sexual dimorphism in the fibers of a clasp muscle *Xenopus laevis*. *Experimental Neurology*, 82, 424-431.



- Schultz, J. D. & Schlinger B.A. (1999). Widespread accumulation of H-3 testosterone in the spinal cord of a wild bird with an elaborate courtship display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10428-10432.
- Shannon C.E. & Weaver W. (1964). *The mathematical theory of communication*. The university of illinois press, Urbana.
- Sheehan M.J., Jinn J. & Tibbetts E.A. (2014). Coevolution of visual signals and eye morphology in *Polistes* paper wasps. *Biology Letters*, 10.
- Siddiqi A., Cronin T.W., Loew E.R., Vorobyev M. & Summers K. (2004). Interspecific and intraspecific views of color signals in the strawberry poison frog *Dendrobates pumilio*. *Journal of Experimental Biology*, 207, 2471-2485.
- Simons M.J.P., Cohen A.A. & Verhulst S. (2012). What does carotenoid-dependent coloration tell ? Plasma carotenoid level signals immunocompetence and oxidative stress state in birds - a meta-analysis. *Plos One*, 7, 14. DOI : 10.1371/journal.pone.0043088
- Smith G.T., Brenowitz E.A., Beecher M.D. & Wingfield J.C. (1997). Seasonal changes in testosterone, neural attributes of song control nuclei, and song structure in wild songbirds. *Journal of Neurosciences*, 17, 6001-6010.
- Solís R. & Penna M. (1997). Testosterone levels and evoked vocal responses in a natural population of the frog *Batrachyla taeniata*. *Hormones and Behavior*, 31, 101-109.
- Spee M., Beaulieu M., Dervaux A., Chastel O., Le Maho Y. & Raclot T. (2010). Should I stay or should I go ? Hormonal control of nest abandonment in a long-lived bird, the Adelie penguin. *Hormones and Behavior*, 58, 762-768.
- Starnberger I., Preininger D. & Hödl W. (2014a). The anuran vocal sac : A tool for multimodal signalling. *Animal Behaviour*, 97, 281-288.
- Starnberger I., Preininger D. & Hoedl W. (2014b). From uni- to multimodality : Towards an integrative view on anuran communication. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 200, 777-787.
- Suarez R.K. (1992). Hummingbird flight - sustaining the highest mass-specific metabolic rates among vertebrates. *Experientia*, 48, 565-570.
- Swindle E.J. & Metcalfe D.D. (2007). The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunological Reviews*, 217, 186-205.
- Szamado S. (2011). The cost of honesty and the fallacy of the handicap principle. *Animal Behaviour*, 81, 3-10.
- Taigen T.L. & Wells K.D. (1985). Energetics of vocalization by an anuran amphibian (*Hyla versicolor*). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 155, 163-170.



- Thornhill R. (1984). Alternative hypotheses for traits believed to have evolved by sperm competition. In: *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press, New York.
- Traish A.M., Abdallah B. & Yu G. (2011). Androgen deficiency and mitochondrial dysfunction : Implications for fatigue, muscle dysfunction, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 8, 431-44.
- Trigunaite A., Dimo J. & Jorgensen T.N. (2015). Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cellular Immunology*, 294, 87-94.
- Troianowski M., Melot G. & Lengagne T. (2014). Multimodality : A way to cope with road traffic noise ? The case of European treefrog (*Hyla arborea*). *Behavioural Processes*, 107, 88-93.
- Van Breda E., Keizer H.A., Vork M.M., Surtel D.A.M., Dejong Y.F., Vandervusse G.J. & Glatz J.F.C. (1992). Modulation of fatty-acid-binding protein-content of rat-heart and skeletal-muscle by endurance training and testosterone treatment. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 421, 274-279.
- Van Doorn G.S. & Weissing F.J. (2004). The evolution of female preferences for multiple indicators of quality. *American Naturalist*, 164, 173-186.
- Vasquez T. & Pfennig K.S. (2007). Looking on the bright side : Females prefer coloration indicative of male size and condition in the sexually dichromatic spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 127-135.
- Velando A., Beamonte-Barrientos R. & Torres R. (2006). Pigment-based skin colour in the blue-footed booby : An honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia*, 149, 535-542.
- Vinkler M. & Albrecht T. (2011). Handling immunocompetence' in ecological studies : Do we operate with confused terms ? *Journal of Avian Biology*, 42, 490-493.
- Voituron Y., Brepson L., Richardson C., Joly P. & Lengagne T. (2012). Energetics of calling in the male treefrog *Hyla arborea* : When being large means being sexy at low cost. *Behaviour*, 149, 775-793.
- Voituron Y., Paaschburg L., Holmstrup M., Barre H. & Ramlov H. (2009). Survival and metabolism of *Rana arvalis* during freezing. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology*, 179, 223-230.
- Weatherhead P.J. & Robertson R.J. (1979). Offspring quality and the polygyny threshold - sexy son hypothesis. *American Naturalist*, 113, 201-208.
- Wells K.D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago.

- Wingfield J.C. (2008). Comparative endocrinology, environment and global change. *General and Comparative Endocrinology*, 157, 207-216.
- Wingfield J.C., Hegner R.E., Dufty A.M. & Ball G.F. (1990). The challenge hypothesis - theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *American Naturalist*, 136, 829-846.
- Wobber V. & Herrmann E. (2014). The influence of testosterone on cognitive performance in bonobos and chimpanzees. *Behaviour*, 152, 407-423.
- Zahavi A. (1975). Mate selection - selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53, 205-214.
- Zahavi A. (1977). Cost of honesty - (further remarks on handicap principle). *Journal of Theoretical Biology*, 67, 603-605.
- Zollinger S.A. & Brumm H. (2015). Why birds sing loud songs and why they sometimes don't. *Animal Behaviour*, 105, 289-295.
- Zuk M. & McKean K.A. (1996). Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology*, 26, 1009-1023.



---

## La testostérone, médiateur de l'honnêteté des signaux sexuels chez *Hyla arborea* ?

---

Chez les mâles, la testostérone joue un rôle important dans l'expression des signaux sexuels attractifs pour la femelle. Cependant, de nombreuses études mettent en évidence l'effet négatif de la testostérone sur les défenses immunitaires ou la résistance aux parasites. Selon l'hypothèse du handicap immunitaire (ICHH, Folstad et Karter, 1992), ce compromis permettrait d'assurer l'honnêteté du signal sexuel ; les mauvais mâles ne pouvant pas exprimer de signaux sexuels de bonne qualité tout en gérant l'immunosuppression due à la testostérone. Ma thèse a pour objectif de définir le rôle de la testostérone dans l'honnêteté des signaux sexuels dans un contexte de communication multimodale. Elle permet également de comprendre les mécanismes physiologiques par lesquels la testostérone module les signaux sexuels acoustiques et visuels chez les mâles *Hyla arborea*, un amphibien connu pour utiliser ces deux types de signaux pour attirer les femelles. Nos résultats montrent que les signaux sexuels acoustiques et visuels chez cette espèce sont testostérone-dépendants. En revanche, puisque la testostérone n'a pas d'effet immunosuppresseur dans notre étude, elle ne serait pas le médiateur direct de l'honnêteté des signaux chez cette espèce. D'un point de vue physiologique, l'effet de la testostérone sur le chant s'explique par l'amélioration des propriétés contractiles des muscles du tronc responsables du chant lié à une augmentation de l'efficacité mitochondriale. D'autre part, les analyses biochimiques montrent que la couleur du sac vocal varie linéairement avec la quantité de pigments caroténoïdes présents dans le plasma, qui pourrait être testostérone-dépendant. Enfin, cette thèse montre également que la testostérone agit sur le comportement de chasse permettant l'acquisition de ressources énergétiques et de caroténoïdes pour le chant et la couleur des mâles.

Mots-clefs : anoures, bioénergétique, caroténoïde, contraction musculaire, hypothèse du handicap immunitaire, testostérone.

---

## Is testosterone the mediator of sexual signal honesty in *Hyla arborea*?

---

In males, testosterone plays an important role on attractive sexual signal expression. However, numerous studies highlighted that testosterone also has negative effects on immunity defenses and parasite resistance capacity. According to the immunocompetence handicap hypothesis (ICHH, Folstad and Karter, 1992), this trade-off assures signal honesty because only good males could express powerful signals while managing the immunosuppression of testosterone. My thesis aims to define the role of testosterone on the signal honesty in a multimodal communication context. Moreover it allows us to understand some physiological mechanisms involved in the modulation of acoustic and visual signals in males *Hyla arborea*, an amphibian known to use both acoustic and visual signals to attract females. Our results show that acoustic and visual signals are testosterone-dependent. In contrast, since testosterone has no immunosuppression effect in our study, it would not be the direct mediator of the signal honesty in this species. From a physiological point of view, the testosterone effects on calls could be explained through the positive effect of testosterone on trunk muscle mitochondrial efficacy and their contractile properties. Besides, biochemical analyses show that vocal sac coloration varies with the amount of carotenoid pigments present in the plasma that could be testosterone-dependent. Finally, this thesis also assumes that testosterone acts on the hunting behavior permitting the acquisition of energy resources and carotenoids for singing and coloration of males.

Key words: anurans, bioenergetic, carotenoid, immunocompetence handicap hypothesis, muscular contraction, testosterone.

---

Champ disciplinaire : **Écophysiologie**